



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|--|-----------|--|
| (51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07D 487/04 | A2 | (11) Numéro de publication internationale: WO 00/02881 (43) Date de publication internationale: 20 janvier 2000 (20.01.00) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01609 (22) Date de dépôt international: 5 juillet 1999 (05.07.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/08731 8 juillet 1998 (08.07.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOCIÉTÉ DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (SCRAS) [FR/FR]; 51/53, rue du Docteur Blanche, F-75016 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PREVOST, Grégoire [FR/FR]; 12, avenue de la Providence, F-92160 Antony (FR). LONCHAMPT, Marie-Odile [FR/FR]; 30, rue Henri Crette, F-94550 Chevilly-Larue (FR). GORDON, Thomas [US/US]; 6 Rainbow Drive, Medway, MA 02053 (US). (74) Mandataire: BOURGOUIN, André; Beaufour Ipsen - SCAF, Direction de la Propriété Industrielle, 42, rue du Docteur Blanche, F-75016 Paris (FR). | | (81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i> |
| (54) Title: USE OF CYSTEINE DERIVATIVES FOR PREPARING A MEDICINE FOR TREATING PATHOLOGIES RESULTING FROM THE FORMATION OF HETEROTRIMERIC G PROTEIN (54) Titre: UTILISATION DE DERIVES DE LA CYSTEINE POUR PREPARER UN MEDICAMENT DESTINE A TRAITER LES PATHOLOGIES QUI RESULTENT DE LA FORMATION DE LA PROTEINE G HETEROTRIMERIQUE | | |
| (57) Abstract <p>The invention concerns the use of cysteine derivatives for preparing a medicine for treating diseases resulting from the formation of heterotrimeric G protein. Said diseases include in particular diseases related to biological functions or the following disorders: smell, taste, light perception, neurotransmission, neurodegeneration, functioning of endocrine and exocrine glands, autocrine and paracrine regulation, blood pressure, embryogenesis, benign cell proliferation, oncogenesis, viral infection, immunological functions, diabetes, obesity, benign and malignant proliferative diseases. Said cystein derivatives comprise in particular: bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylmethyl)-2-(2-methoxyphenyl)-5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,2a]pyrazine (I) disulphide; and bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(1-naphthyl)-8-(2-methylpropyl)-5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,2a]pyrazin-7-yl) disulphide (II).</p> | | |
| (57) Abrégé <p>L'invention concerne l'utilisation de dérivés de la cystéine pour préparer un médicament destiné à traiter des maladies qui résultent de la formation de la protéine G hétérotrimérique. Ces maladies comprennent en particulier des maladies liées aux fonctions biologiques ou désordres suivants: odorat, goût, perception de la lumière, neurotransmission, neurodégénérescence, fonctionnement des glandes endocrines et exocrines, régulation autocrine et paracrine, tension artérielle, embryogénèse, prolifération cellulaire bénigne, oncogénèse, infection virale, fonctions immunologiques, diabète, obésité, et maladies prolifératives bénignes et malignes. Lesdits dérivés de la cystéine comprennent en particulier: le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine (I); et le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(1-naphtyl)-8-(2-méthylpropyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazin-7-yle) (II).</p> | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | | | |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie | ES | Espagne | LS | Lesotho | SI | Slovénie |
| AM | Arménie | FI | Finlande | LT | Lituanie | SK | Slovaquie |
| AT | Autriche | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Sénégal |
| AC | Australie | GA | Gabon | LV | Lettonie | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaïdjan | GB | Royaume-Uni | MC | Monaco | TD | Tchad |
| BA | Bosnie-Herzégovine | GE | Géorgie | MD | République de Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbade | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tadjikistan |
| BE | Belgique | GN | Guinée | MK | Ex-République yougoslave de Macédoine | TM | Turkménistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | ML | Mali | TR | Turquie |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | MN | Mongolie | TT | Trinité-et-Tobago |
| BJ | Bénin | IE | Irlande | MR | Mauritanie | UA | Ukraine |
| BR | B Brésil | IL | Israël | MW | Malawi | UG | Ouganda |
| BY | Bélarus | IS | Islande | MX | Mexique | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada | IT | Italie | NE | Niger | UZ | Ouzbékistan |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon | NL | Pays-Bas | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NO | Norvège | YU | Yougoslavie |
| CH | Suisse | KG | Kirghizistan | NZ | Nouvelle-Zélande | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | République populaire démocratique de Corée | PL | Pologne | | |
| CM | Cameroun | KR | République de Corée | PT | Portugal | | |
| CN | Chine | KZ | Kazakstan | RO | Roumanie | | |
| CU | Cuba | LC | Sainte-Lucie | RU | Fédération de Russie | | |
| CZ | Republique tchèque | LI | Liechtenstein | SD | Soudan | | |
| DE | Allemagne | LK | Sri Lanka | SE | Suède | | |
| DK | Danemark | LR | Libéria | SG | Singapour | | |
| EE | Estonie | | | | | | |

Utilisation de dérivés de la cystéine pour préparer un médicament destiné à traiter les pathologies qui résultent de la formation de la protéine G hétérotrimérique

La présente invention concerne notamment l'utilisation de dérivés de la cystéine pour préparer un médicament destiné à traiter des pathologies qui résultent de la formation de la protéine G hétérotrimérique. Ces maladies comprennent en particulier des maladies liées aux fonctions biologiques ou désordres suivants : odorat, goût, perception de la lumière, neurotransmission, neurodégénérescence, fonctionnement des glandes endocrines et exocrines, régulation autocrine et paracrine, tension artérielle, embryogénèse, prolifération cellulaire bénigne, oncogénèse, infection virale, fonctions immunologiques, diabète, obésité, et maladies prolifératives bénignes et malignes.

Les protéines G sont en fait l'association structurale de trois sous-unités distinctes appelées α , β et γ , mais fonctionnent comme des entités dissociables constituées par des sous-unités α d'un côté et des dimères β / γ de l'autre.

Les protéines G participent à la transmission de signaux de l'extérieur de la cellule grâce à son interaction avec les récepteurs à sept domaines transmembranaires vers l'intérieur par l'intermédiaire de différents effecteurs incluant l'adénylate cyclase, la phospholipase C ou encore les canaux ioniques. L'enzyme adénylate cyclase génère de l'AMP cyclique (AMPc) (cf. Gilman, A.G. *Biosci.Rep.* **15**, 65-97 (1995)). Ainsi, on sait que pour activer l'adénylate cyclase, il est nécessaire que les protéines G soient transitoirement dans une forme hétérotrimérique, forme dans laquelle le monomère constitué par une sous-unité α est associée au dimère constitué par les sous-unités β et γ . C'est uniquement dans cette situation que le signal de l'extérieur de la cellule peut activer la sous-unité α d'une protéine G, laquelle pourra après dissociation moduler l'adénylate cyclase et moduler la production d'AMPc.

On sait aussi que les dimères β / γ peuvent activer directement des effecteurs conduisant à l'activation de kinases régulées par des signaux extracellulaires (ERKs) ou des MAP kinases. Un lien direct entre les sous-unités β / γ et les kinases src ou *src like* a été démontré (cf. Gutkind, J.S. *J.Biol.Chem.* **273**, 1839-1842 (1998)).

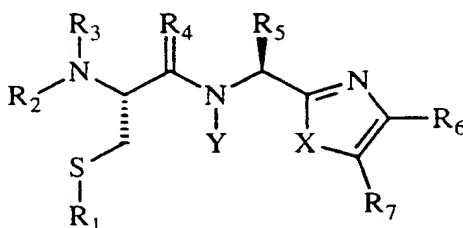
Par ailleurs, des toxines bactériennes comme *Vibrio cholera* et *Bortella pertussis*, des peptides comme le mastoparan et la suramine ont été présentés comme modulant directement l'activité des protéines G (cf. Freissmuth, M., Boehm, S., Beindl, W., et coll. *Mol.Pharmacol.* **49**, 602-611 (1996) ; Boehm, S., Huck, S., Motejlek, A., et coll. *Journal of Neurochemistry* **66**, 1019-1026 (1996) ; Cachero, T.G., Rigual, R.,

Rocher, A. & Gonzalez, C. *Eur.J.Neurosci.* 8, 2320-2327 (1996) ; Danilenko, M., Worland, P., Carlson, B., Sausville, E.A. & Sharoni, Y. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **196**, 1296-1302 (1993) ; Beindl, W., Mitterauer, T., Hohenegger, M., Ijzerman, A.P., Nanoff, C. & Freissmuth, M. *Mol.Pharmacol.* **50**, 415-423 (1996)).

Par exemple, la toxine cholérique modifie la sous-unité α_5 de la protéine G par addition d'un ADP-ribose provenant du NAD à un site accepteur spécifique arginine. Ceci bloque complètement l'activité de la GTPase, provoquant une stimulation persistante de son effecteur suivant, l'adénylate cyclase et conduisant à une surproduction d'AMPc.

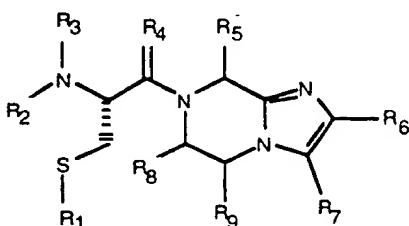
Les effets néfastes d'un taux anormal d'AMPc sont également connus et ont notamment lieu au niveau des fonctions biologiques ou désordres suivants : odorat, goût, perception de la lumière, neurotransmission, neurodégénérescence, fonctionnement des glandes endocrines et exocrines, régulation autocrine et paracrine, tension artérielle, embryogénèse, prolifération cellulaire bénigne, oncogénèse, infection virale et fonctions immunologiques, diabète et obésité.

La demanderesse vient de découvrir que certains dérivés de la cystéine, à savoir les composés de formule générale (A)

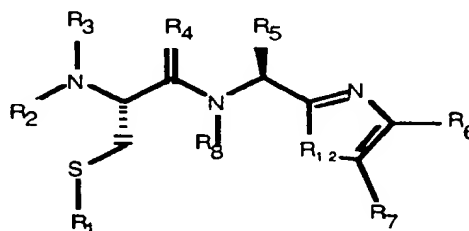


(A)

correspondant aux sous-formules (A1) ou (A2) :



(A1)



(A2)

dans lesquelles :

X représente R_{12} et Y représente R_8 , ou X et Y complètent un cycle à 6 chaînons, l'ensemble X-Y représentant le radical $-\text{CH}(R_8)-\text{CH}(R_9)-$;

R_1 représente H, un radical alkyle ou alkylthio inférieur ;

5 R_2 et R_3 représentent indépendamment H ou un radical alkyle inférieur ;

R_4 représente H_2 ou O ;

R_5 représente H, ou l'un des radicaux alkyle inférieur, alkényle inférieur, alkynyle inférieur, aryle, arylalkyle inférieur, hétérocycle ou hétérocycle alkyle inférieur, ces radicaux pouvant éventuellement être substitués par des radicaux choisis parmi le groupe
10 composé d'un radical alkyle inférieur, $-\text{O}-R_{10}$, $-\text{S}(\text{O})_m R_{10}$ (m représentant 0, 1, ou 2), $-\text{N}(\text{R}_{10})(\text{R}_{11})$, $-\text{N}-\text{C}(\text{O})-R_{10}$, $-\text{NH}-(\text{SO}_2)-R_{10}$, $-\text{CO}_2-R_{10}$, $\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}_{10})(\text{R}_{11})$, et $-(\text{SO}_2)-\text{N}(\text{R}_{10})(\text{R}_{11})$;

R_6 et R_7 représentent indépendamment H, un radical $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CHR}_{13}-\text{CO}_2 R_{14}$, ou l'un des radicaux alkyle inférieur, aryle, arylalkyle inférieur, hétérocycle ou hétérocycle
15 alkyle inférieur, ces radicaux pouvant éventuellement être substitués par des radicaux choisis parmi le groupe composé des radicaux OH, alkyle ou alkoxy inférieur, $\text{N}(\text{R}_{10})(\text{R}_{11})$, COOH, $\text{CON}(\text{R}_{10})(\text{R}_{11})$, et halo, ou R_6 et R_7 forment ensemble un radical aryle ou un hétérocycle ;

R_8 et R_9 représentent indépendamment, H, ou l'un des radicaux alkyle inférieur, aryle, arylalkyle inférieur, hétérocycle ou hétérocycle alkyle inférieur, ces radicaux pouvant
20 éventuellement être substitués par des radicaux choisis parmi le groupe composé des radicaux OH, alkyle ou alkoxy inférieur, $\text{N}(\text{R}_{10})(\text{R}_{11})$, COOH, $\text{CON}(\text{R}_{10})(\text{R}_{11})$ et halo, ou R_8 et R_9 forment ensemble un radical aryle ou un hétérocycle ;

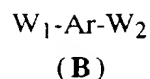
R_{10} et R_{11} , représentent indépendamment H, un radical aryle ou hétérocycle, ou un
25 radical alkyle, arylalkyle ou hétérocycle alkyle inférieur ;

R_{12} représente NR_9 , S, ou O ;

R_{13} représente un radical alkyle inférieur éventuellement substitué par un radical choisi parmi les radicaux alkyle inférieur, $-\text{OR}_{10}$, $-\text{S}(\text{O})_m R_{10}$ (m représentant 0, 1, ou 2) et $-\text{N}(\text{R}_{10})(\text{R}_{11})$;

30 R_{14} représente H ou un radical alkyle inférieur ;

ou les composés de formule générale (B) :



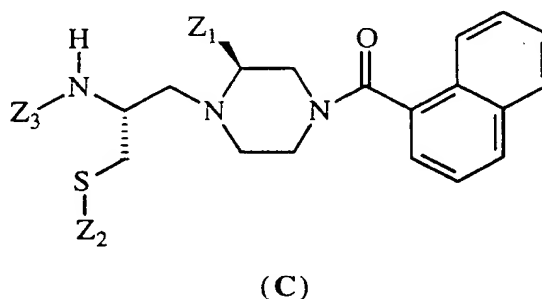
dans laquelle :

- 5 W_1 représente un reste issu d'une cystéine sous forme réduite ou non réduite ;

Ar représente un radical dérivé d'un acide aminobenzoïque dont le noyau aromatique est éventuellement substitué ;

W_2 représente un acide aminé, de préférence un acide aminé aliphatique ;

ou encore les composés de formule générale (C) :



- 10 dans laquelle :

Z_1 représente un radical alkyle inférieur ;

Z_2 et Z_3 représentent tous deux H ou bien Z_2 et Z_3 forment ensemble une chaîne ayant de 2 à 4 éléments choisis parmi les radicaux $-\text{C(O)}-$, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ et $-\text{S}-$, étant entendu que deux éléments successifs ne sont pas tous deux $-\text{C(O)}-$;

- 15 étant entendu que les composés de formule générale (C) peuvent également se présenter sous forme de dimères, lorsque le radical Z_2 représente un atome d'hydrogène pouvant être éliminé par oxydation ;

ou encore un sel pharmaceutiquement acceptable d'un composé de formule générale (A), (B) ou (C) ;

- 20 peuvent être utilisés pour préparer des médicaments destinés à traiter des pathologies qui résultent de la formation de la protéine G hétérotrimérique.

Par radical alkyle inférieur, on entend un radical alkyle linéaire ou ramifié comptant de 1 à 6 atomes de carbone, et notamment les radicaux méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, butyle, isobutyle, sec-butyle et tert-butyle, pentyle, néopentyle, isopentyle, hexyle, isohexyle. Par radical hétérocycle, on entend un radical constitué de un ou plusieurs cycles et incluant au moins un hétéroatome. Par radical arylalkyle, hétérocycle alkyle, alkylthio ou alkoxy inférieur, on entend les radicaux dont le radical alkyle a la signification indiquée précédemment.

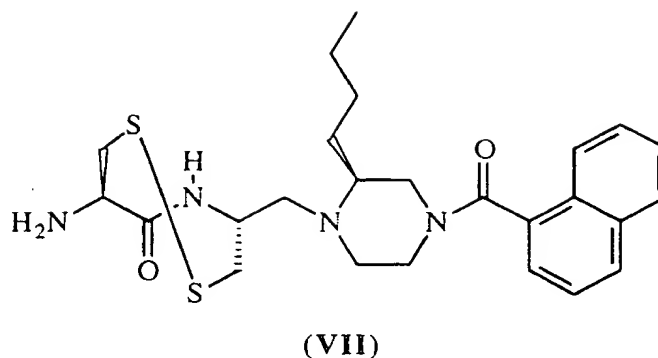
De préférence, le radical Ar compris dans la formule (B) est éventuellement substitué par un radical alkyle comportant de 1 à 6 atomes de carbone ou un radical aryle, ces radicaux alkyle ou aryle étant eux mêmes éventuellement substitués préférentiellement par un radical alkoxy ayant de 1 à 4 atomes de carbone, fluoro, chloro, bromo. Le radical aryle de préférence un phényle peut lui même être substitué par un radical alkyle.

De préférence encore, les composés de formule générale (B) seront tels que Ar représente un radical dérivé d'un acide aminobenzoïque dont le noyau aromatique est substitué par un radical phényle et W₂ représente un acide aminé aliphatique.

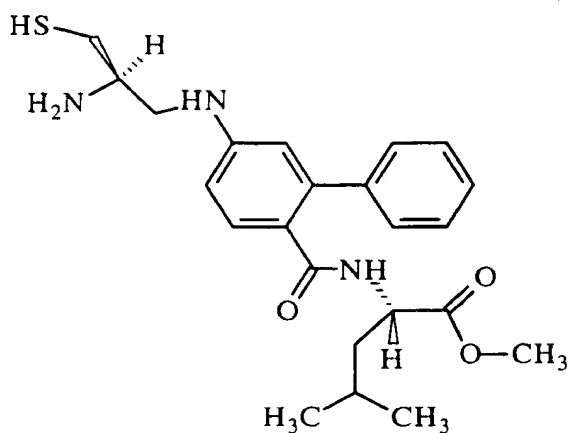
En particulier, les composés suivants peuvent être utilisés pour préparer des médicaments destinés à traiter des pathologies qui résultent de la formation de la protéine G hétérotrimérique :

- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthylphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-butyl-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(1-méthylpropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 1-[2(R)-amino-3-mercaptopropyl]-2(S)-n-butyl-4-(1-naphtoyl)pipérazine ;
- le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(méthoxyphényl)-8-(1-méthylpropyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine] ;
- le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine] ;
- le disulfure de bis-1,1'-7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(1-naphtyl)-8-(2-méthylpropyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazin-7-yle) ;

- le composé de formule :



- le composé de formule :

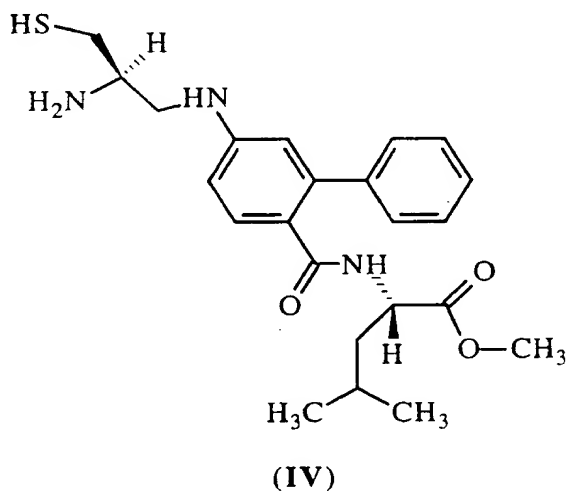


- 5 - la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-phényl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénylméthoxy)méthyl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(1-phénylméthoxy)éthyl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- 10 - la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénoxyéthyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénoxyéthyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine, ou sa forme dimérique ;
- 15 - et la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénylesulfonylethyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;

ou encore un sel pharmaceutiquement acceptable d'un de ces composés.

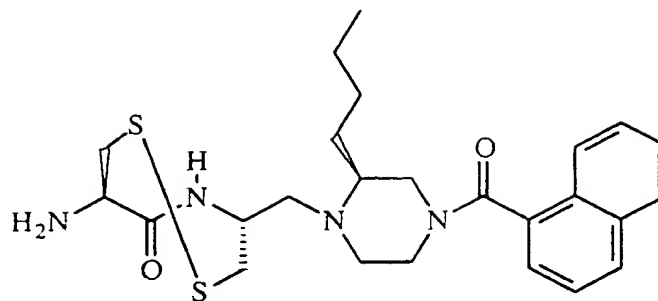
On utilisera de préférence l'un des composés suivants pour l'invention :

- le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine (I) ;
- 5 - le disulfure de bis-1,1'-7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-(2-(1-naphtyl)-8-(2-méthylpropyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazin-7-yle) (II) ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthylphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine (III) ;
- le composé de formule :



- 10 - la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-butyl-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine (V) ;
- le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(méthoxyphényl)-8-(1-méthylpropyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine] (VI) ;

- le composé de formule :



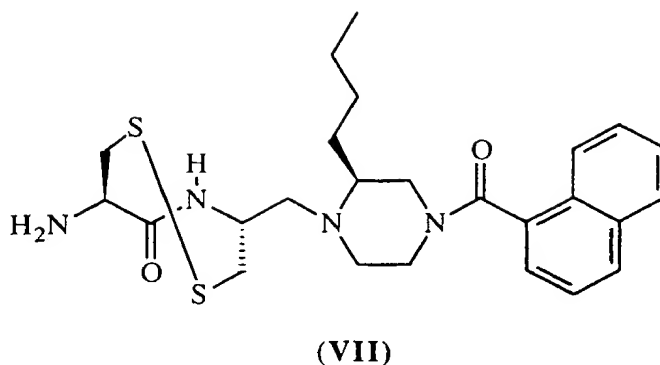
(VII)

- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylmethyl)-2-phényl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(1-méthylpropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 1-[2(R)-amino-3-mercaptopropyl]-2(S)-n-butyl-4-(1-naphtoyl)pipérazine.
- ou un sel pharmaceutiquement acceptable d'un de ces derniers.

Plus préférentiellement, l'un des composés suivants sera utilisé pour l'invention :

- le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylmethyl)-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine (I) ;
- le disulfure de bis-1,1'-7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(1-naphtyl)-8-(2-méthylpropyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazin-7-yle (II) ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylmethyl)-2-(2-méthylphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine (III) ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-butyl-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine (V) ;

- le composé de formule :



- ou un sel pharmaceutiquement acceptable d'un de ces derniers.

Enfin, les composés suivants seront plus particulièrement préférés :

- le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-
2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine (I) ;

- le disulfure de bis-1,1'-7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-(2-(1-naphtyl)-
8-(2-méthylpropyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazin-7-yle) (II) ;

- ou un sel pharmaceutiquement acceptable d'un de ces derniers.

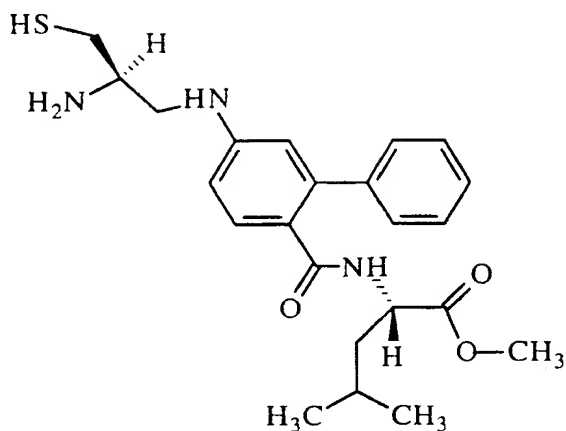
L'invention concerne donc tout d'abord l'utilisation des composés de formule générale (A), (B) ou (C) tels que décrits précédemment pour préparer un médicament destiné à traiter des pathologies qui résultent de la formation de la protéine G hétérotrimérique. En particulier, elle concerne l'utilisation desdits inhibiteurs pour préparer des médicaments destinés à traiter des maladies liées aux fonctions biologiques ou désordres suivants : odorat, goût, perception de la lumière, neurotransmission, neurodégénérescence, fonctionnement des glandes endocrines et exocrines, régulation autocrine et paracrine, tension artérielle, embryogénèse, infection virale, fonctions immunologiques, diabète et obésité.

De façon plus particulière, l'invention concerne l'utilisation des composés de formule générale (A), (B) ou (C) pour préparer un médicament destiné à traiter le choléra, le Syndrome Immuno-Déficitaire Acquis (SIDA), la diarrhée du voyageur et la puberté précoce familiale masculine.

L'invention a aussi pour objet de nouveaux produits de formule générale (A) numérotés de 1 à 7 et décrits ci-après dans les exemples, à savoir :

- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthylphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
 - la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-phényl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
 - 5 - la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénylméthoxy)méthyl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
 - la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(1-phénylméthoxy)éthyl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
 - la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénoxyéthyl)-
10 5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
 - la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénoxyéthyl)-5,6,7,8-tétrahydro-imidazo[1,2a]pyrazine, ou sa forme dimérique ;
 - et la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénylesulfonylethyl)-5,6,7,8-tétrahydro-imidazo[1,2a]pyrazine.
- 15 Elle a également pour objet lesdits nouveaux produits ou leurs sels pharmaceutiquement acceptables à titre de médicaments, ainsi que leur utilisation pour préparer un médicament destiné à traiter des pathologies qui résultent de la formation de la protéine G hétérotrimérique. En particulier, elle concerne l'utilisation desdits produits pour préparer des médicaments destinés à traiter des maladies liées aux fonctions biologiques ou
- 20 désordres suivants : odorat, goût, perception de la lumière, neurotransmission, neurodégénérescence, fonctionnement des glandes endocrines et exocrines, régulation autocrine et paracrine, tension artérielle, embryogénèse, prolifération cellulaire bénigne, oncogénèse, infection virale, fonctions immunologiques, diabète, obésité, et maladies prolifératives bénignes et malignes.
- 25 Les produits particulièrement préférés pour une utilisation selon l'invention seront donc les suivants :
- le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
 - le disulfure de bis-1,1'-7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(1-naphtyl)-
30 8-(2-méthylpropyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazin-7-yle) ;

- le composé de formule :



- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthylphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- 5 - la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-phényl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénylméthoxy)méthyl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(1-phénylméthoxy)éthyl-10 5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénoxyéthyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénoxyéthyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine, ou sa forme dimérique ;
- 15 - et la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénylesulfonylethyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- ou un sel pharmaceutiquement acceptable d'un de ces derniers.

De même, l'invention concerne plus particulièrement l'utilisation des composés précédemment cités pour préparer un médicament destiné à traiter le choléra, le Syndrome
 20 Immuno-Déficitaire Acquis (SIDA), la diarrhée du voyageur et la puberté précoce familiale masculine.

Les composés de formule générale (A) et leur préparation sont décrits dans la demande de brevet WO 97/30053 ou dans les exemples ci-après. Les composés de formule générale (B) et leur préparation sont décrits dans la demande de brevet WO 96/21456. Enfin, la préparation des composés de formule générale (C) est décrite dans la demande
5 de brevet PCT WO 95/00497, sauf pour le composé de formule (VII) pour lequel la synthèse est décrite dans la partie expérimentale de cette demande.

Les compositions pharmaceutiques comprenant un composé de l'invention peuvent être sous forme de solides, par exemple des poudres, des granules, des comprimés, des gélules, des liposomes ou des suppositoires. Les supports solides appropriés peuvent
10 être, par exemple, le phosphate de calcium, le stéarate de magnésium, le talc, les sucres, le lactose, la dextrine, l'amidon, la gélatine, la cellulose, la cellulose de méthyle, la cellulose carboxyméthyle de sodium, la polyvinylpyrrolidine et la cire.

Les compositions pharmaceutiques comprenant un composé de l'invention peuvent aussi se présenter sous forme liquide, par exemple, des solutions, des émulsions, des
15 suspensions ou des sirops. Les supports liquides appropriés peuvent être, par exemple, l'eau, les solvants organiques tels que le glycérol ou les glycols, de même que leurs mélanges, dans des proportions variées, dans l'eau.

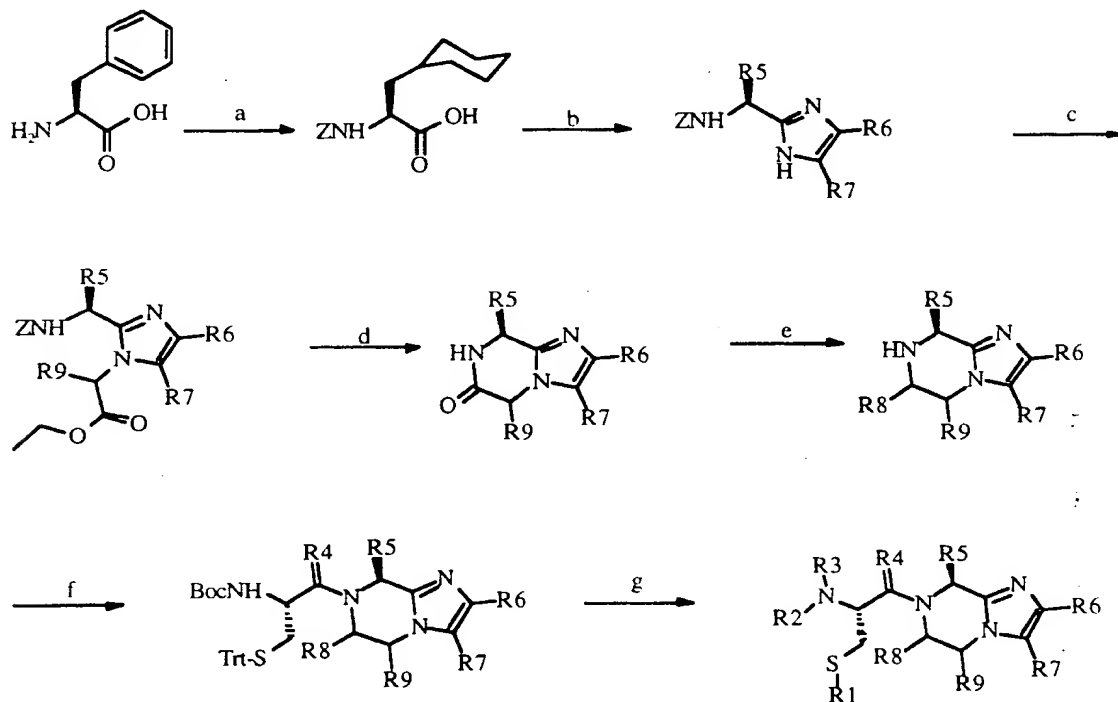
L'administration d'un médicament selon l'invention pourra se faire par voie topique, orale, parentérale, par injection (intramusculaire, sous-cutanée, intraveineuse, etc.), etc.
20 La voie d'administration dépendra bien entendu du type de maladie à traiter.

La dose d'administration envisagée pour un médicament selon l'invention est comprise entre 0,1 mg à 10 g suivant le type de pathologie à traiter.

A moins qu'ils ne soient définis d'une autre manière, tous les termes techniques et scientifiques utilisés ici ont la même signification que celle couramment comprise par un
25 spécialiste ordinaire du domaine auquel appartient cette invention. De même, toutes les publications, demandes de brevets, tous les brevets et toutes autres références mentionnées ici sont incorporées par référence.

EXEMPLES**Exemple 1 : 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-
2-(2-méthylphényl)-
5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine : 1**

5 Le composé 1 a été préparé selon le schéma synthétique ci-dessous :

**Schéma 1****1.a) Carbobenzyloxy-L-cyclohexylalanine**

De la L-phénylalanine (10,0 g ; 60,6 mmol) est combinée avec PtO_2 (430 mg) dans de l'acide acétique (60 ml) et le mélange est hydrogéné sous 20-50 psi H_2 durant une nuit. Une solution aqueuse de HCl à 5% est ajoutée au mélange pour obtenir une solution
 10 limpide et l'hydrogénation est poursuivie jusqu'à ce que la consommation d'hydrogène cesse. Le catalyseur est éliminé par filtration et le filtrat concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans du méthanol et de l'eau et le pH ajusté à 4,4 par addition d'une solution de NaOH à 10%. Le produit obtenu est récupéré par filtration et utilisé sans purification supplémentaire.

15 La L-cyclohexylalanine (60,6mmol) est mise en suspension dans de l'eau (100 ml), du K_2CO_3 (8,36 g ; 60,6 mmol) est ajouté, puis une solution de

N-(benzyloxycarbonyloxy)succinimide (15,1 g ; 60,6 mmol) dans CH₃CN (150 ml) et le mélange obtenu est agité vigoureusement durant 45 minutes. Le mélange est concentré pour donner un volume d'environ 100 ml et lavé avec Et₂O (100 ml), puis acidifié avec HCl concentré et extrait avec AcOEt (2x 50 ml). Les phases AcOEt combinées sont
5 séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées pour donner une huile claire (17,27 g ; 93 %).

RMN ¹H (DMSO-d₆) : 7,5-7,6 (1H, d) ; 7,2-7,5 (5H, m) ; 5,0-5,1 (2H, s) ; 3,9-4,1 (1H, m) ; 0,7-1,8 (13H, m).

10 **1.b) 2-(1-(S)-((phénylméthoxy)carbonyl)-amino-2-(cyclohexyl)méthyl)-4-(2-méthylphényl)-imidazole**

De la Cbz-(L)-cyclohexylalanine (4,58 g ; 15,0 mmol) et du Cs₂CO₃ (2,44 g ; 7,50 mmol) sont placés dans un mélange 2:1 de DMF:H₂O (75 ml). Le mélange obtenu est agité jusqu'à ce qu'il devienne homogène. Les solvants sont éliminés sous pression réduite, le résidu dissous dans du DMF (60 ml) et de la 2-bromo-2'-méthylacétophénone
15 (3,20g ; 15,0 mmol) dans du DMF (30 ml) est ajoutée. Le mélange est agité une nuit durant à température ambiante puis filtré et concentré sous pression réduite. Le céto-ester obtenu est mis en solution dans des xylènes (100 ml) et de l'acétate d'ammonium (19,5 g ; 0,25 mol) est ajouté. Le mélange est chauffé à reflux pendant environ 3 heures avec élimination de AcONH₄ excédentaire et de l'eau libérée par le biais d'un
20 piège de Dean-Stark. Le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite, repris dans AcOEt et lavé avec une solution saturée de NaHCO₃ (100 ml) et une solution saturée de NaCl (100 ml). La phase AcOEt est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée sous vide. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un mélange CHCl₃/MeOH 98/2 comme éluant. Les fractions contenant le produit
25 pur sont combinées et concentrées pour donner le produit (2,52 g ; 40 %) sous forme d'une mousse légèrement brune qui est utilisée dans l'étape suivante sans purification supplémentaire.

1.c) 2-(1-(S)-((phénylméthoxy)carbonyl)-amino-2-(cyclohexyl)méthyl)-1-((2-éthoxy-2-oxo)éthyl)-4-(2-méthylphényl)-imidazole

30 L'intermédiaire 1.b (2,52 g ; 6,0 mmol) est mis en solution dans du DMF (20 ml) et traité avec K₂CO₃ (1,67g, 12,1mmol) et du bromoacétate d'éthyle (1,34 ml ; 12,5 mmol) est ajouté. Le mélange obtenu est chauffé à 45° C pendant une heure et demie. Le mélange est dilué avec de l'éther (50 ml) et lavé avec une solution saturée de NaHCO₃ solution (50 ml) puis avec une solution saturée de NaCl (50 ml). La

couche étherée est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée pour donner une huile qui est utilisée dans l'étape suivante sans purification supplémentaire.

Spec. masse : 504,3 MH+.

1.d) 8-(cyclohexylméthyl)-6-oxo-2-(2-méthylphényl)-imidazo[1,2-a]pyrazine

- 5 L'intermédiaire brut de l'étape 1.c est mis en solution dans de l'acide acétique (50 ml) contenant un catalyseur Pd 10% sur carbone (152 mg), puis hydrogéné sous une pression de 50 psi de H₂ pendant 18 heures à température ambiante. Le catalyseur est éliminé par filtration et le filtrat chauffé à 70° C pendant 2 heures. Le mélange obtenu est concentré sous pression réduite, dissous dans CH₂Cl₂ (100 ml) et lavé avec une solution saturée de NaHCO₃ (100 ml). La couche du CH₂Cl₂ est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée pour donner une huile visqueuse qui est utilisée dans l'étape suivante sans purification supplémentaire.

10 Spec. masse : 324,3 MH+.

1.e) 8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthylphényl)-4,5,6,7-tétrahydro-imidazo[1,2-a]pyrazine

- L'intermédiaire brut de l'étape 1.c est mis en solution dans du THF (25 ml) et traité à température ambiante par une solution 1M de BH₃ dans du THF (25 ml) durant une demi-heure puis porté à reflux pendant 1 heure. Le mélange est refroidi par un bain de glace et du HCl 4N (40 ml) est additionné goutte à goutte à 0° C. Le mélange est ramené à température ambiante puis porté à reflux durant 1 heure. Le milieu réactionnel est ensuite refroidi, filtré et concentré sous pression réduite. Le résidu est traité avec une solution saturée de NaHCO₃ (50 ml) et extrait avec CH₂Cl₂ (3x 50 ml). Les phases de CH₂Cl₂ sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées pour donner une huile légèrement brune (1,63 g ; rendement de 87 % par rapport aux étapes 1.c, 1.d et 1.e).

20 Spec. masse : 310,3 MH+.

1.f) 8-(cyclohexylméthyl)- 7-[2-(((1,1-diméthyléthoxy)carbonyl)amino)-1-oxo-3-((triphénylméthyl)thio)propyl]- 2-(2-méthylphényl)-4,5,6,7-tétrahydro-imidazo-[1,2a]-pipérazine

- Du diisopropylcarbodiimide (908 µl ; 5,80 mmol) et du BocCys(trt)-OH (5,37g ; 11,6 mmol) sont mis en solution dans CH₂Cl₂ (25 ml), le mélange obtenu étant agité durant 45 minutes. De la 8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthylphényl)-4,5,6,7-tétrahydro-imidazo[1,2-a]pyrazine (1,63 g ; 5,27 mmol) est ensuite ajoutée. Le mélange réactionnel est agité durant une nuit à température ambiante. Le solvant est éliminé sous pression réduite et le produit obtenu purifié par chromatographie éclair sur gel de silice

avec un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98/2 comme éluant. Les fractions pures sont concentrées pour donner une huile visqueuse qui est utilisée dans l'étape suivante sans purification supplémentaire.

Spec. masse : 755,6 MH^+ .

5 **1.g) 7-(2-amino-1-oxo-3-(mercaptopropyl))-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthylphényl)-4,5,6,7-tétrahydro-imidazo-[1,2a]-pipérazine : 1 :**

L'intermédiaire de l'étape 1.f (3,54 g ; 4,69 mmol) est mis en solution dans de l'acide trifluoroacétique (TFA, 80 ml) contenant du triisopropylsilane (1,92 ml ; 9,38 mmol) et le mélange réactionnel est agité à température ambiante sous azote durant une heure. Le
10 mélange réactionnel est filtré et le filtrat concentré sous pression réduite. Le résidu est extrait par trituration avec une solution aqueuse de TFA à 0,1 % (6x 65 ml) et filtré. Le produit brut est purifié par HPLC préparative sur une colonne C18 en utilisant un gradient de 0 à 20 % de CH_3CN dans une solution aqueuse de TFA à 0,1 % durant 30 minutes. Les fractions pures de produit sont rassemblées et lyophilisées. Le produit
15 initial est lyophilisé par deux fois à partir d'une solution diluée de HCl pour donner le produit sous forme de son chlorhydrate (740 mg ; 32 %).

Spec. masse : 413,2 MH^+ .

RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) : 8,5-9,0 (3H, d, large) ; 7,8-8,0 (1H, s) ; 7,5-7,7 (1H, d) ;
7,2-7,5 (3H, m) ; 5,8-6,1 (1H, m) ; 4,65-4,8 (1H, s) ; 4,5-4,7 (1H, d) ;
20 4,1-4,4 (2H, m) ; 3,8-4,0 (1H, m) ; 3,2-3,7 (H_2O) ; 2,8-3,1 (2H, m) ; 2,35-2,5 (3H, s) ; 2,0-2,2 (1H, m) ; 1,8-2,05 (2H, m) ; 1,25-1,4 (4H, s large) ; 1,3-0,9 (6H, m).

Exemple 2 : 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-phényl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine : 2 :

Le composé **2** est préparé selon le schéma 1, étapes b à g, selon une méthode analogue à
25 celle de l'exemple 1, la 2-bromoacétophénone remplaçant la 2-bromo-2'-méthylacétophénone dans l'étape b.

Spec. masse : 399,2 MH^+ .

RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) : 8,5-8,9 (3H, d large) ; 8,0-8,2 (1H, s) ; 7,8-8,0 (2H, d) ;
7,45-7,56 (2H, t) ; 7,35-7,5 (1H, t) ; 5,9-6,05 (1H, s large) ; 4,65-4,8 (1H, s) ;
30 4,5-4,65 (1H, d) ; 4,1-4,35 (2H, m) ; 3,8-4,0 (1H, m) ; 3,2-3,8 (H_2O) ; 3,25-3,4 (1H, t) ; 2,8-3,05 (2H, m) ; 2,05-2,2 (1H, d) ; 1,85-2,05 (2H, t) ; 1,55-1,75 (4H, s large) ; 1,15-1,3 (1H, s large) ; 1,2-0,9 (5H, m).

**Exemple 3 : 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-
8-(phénylméthoxy)méthyl-
5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine : 3 :**

Le composé **3** est préparé selon le schéma 1, étapes b à g, selon une méthode analogue à celle de l'exemple 1, le Boc-(L)-Ser(Bzl)-OH remplaçant la Cbz-(L)-cyclohexylalanine dans l'étape b et l'étape d étant remplacée par une déprotection utilisant le TFA et $i\text{Pr}_3\text{SiH}$ selon une méthode analogue à la réaction 1.g. Le produit est obtenu sous forme d'un couple de diastéréoisomères dans une proportion 2:3.

Spec. masse : 453,2 MH⁺.

Les temps de rétention pour les diastéréoisomères sont de 6,58 et 7,07 minutes respectivement dans le système de HPLC suivant :

Eluant : 30-50% CH₃CN / 0.1% TFA

Durée d'élution : 24 minutes

Détection : 254 nm

Colonne : protéine Vydac et peptide C18

**Exemple 4 : 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-
8-(1-phénylméthoxy)éthyl-
5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine : 4 :**

Le composé **4** est préparé selon le schéma 1, étapes b à g, selon une méthode analogue à celle de l'exemple 3, le Boc-(L)-Thr(Bzl)-OH remplaçant le Boc-(L)-Ser(Bzl)-OH dans l'étape b.

Spec. masse : 467,3 MH⁺.

RMN ¹H (DMSO-d₆) : 8,5-8,9 (3H, d, large) ; 8,0-8,1 (1H, s) ; 7,95-8,1 (2H, d) ; 7,4-7,5 (1H, t) ; 7,15-7,3 (1H, d) ; 7,0-7,2 (3H, m) ; 6,9-7,05 (2H, m) ; 5,85-5,95 (1H, d) ; 4,75-4,85 (1H, s large) ; 4,65-4,8 (1H, s large) ; 4,35-4,65 (3H, m) ; 4,1-4,25 (2H, q) ; 3,9-4,0 (3H, s) ; 2,8-3,1 (2H, m) ; 1,2-1,4 (3H, d).

**Exemple 5 : 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-
8-(phénoxyéthyl)-
5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine : 5 :**

Le composé 5 a été préparé selon le schéma synthétique ci-après :

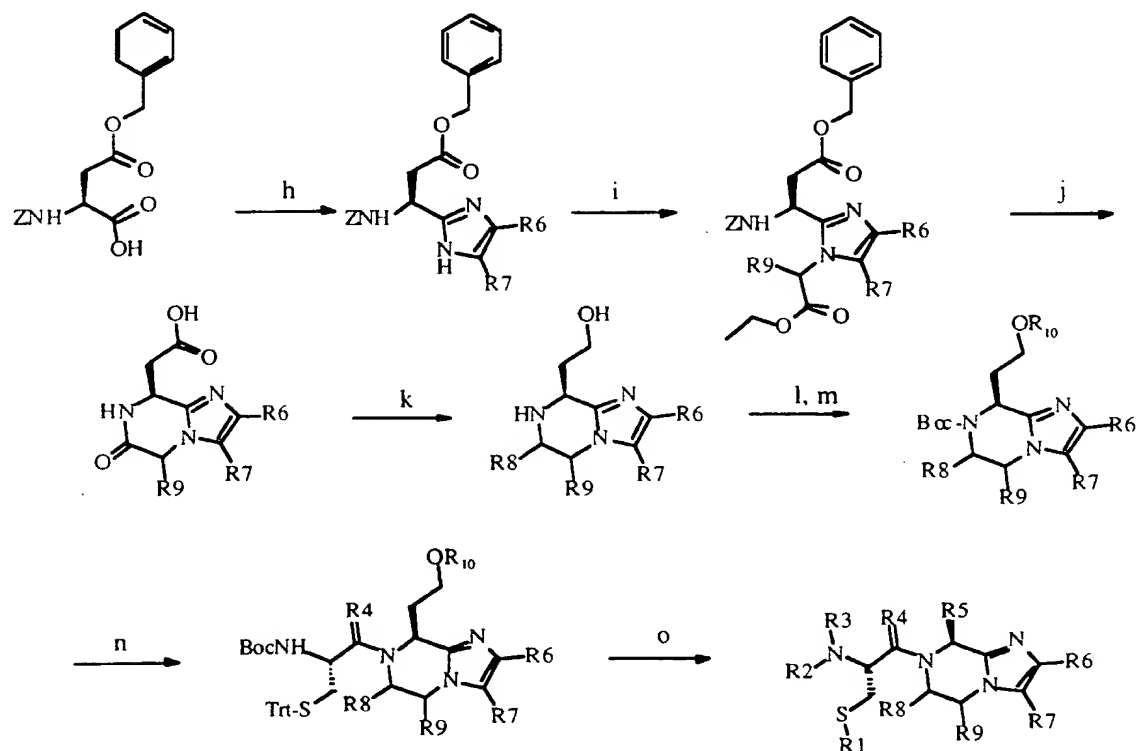


Schéma 2

**5 5.h) 2-(1-(S)-((phénylméthoxy)carbonyl)-amino-2-(2-oxo-2-(phénylméthoxy)éthyl)-
4-(2-méthoxyphényl)-imidazole**

Du $\text{Cbz}-(\text{L})-\text{Asp}(\text{Obzl})-\text{OH}$ (5,00 g ; 14,0 mmol) et du Cs_2CO_3 (2,28 g ; 7,00 mmol) sont mélangés dans un mélange 1:1 de $\text{DMF}:\text{H}_2\text{O}$ (75 ml). Le mélange obtenu est agité jusqu'à ce qu'il devienne homogène. Les solvants sont éliminés sous pression réduite, le résidu dissous dans du DMF (60 ml) et de la 2-bromo-2'-méthoxyacétophénone (3,21 g ; 14,0 mmol) dans du DMF (30 ml) est ajoutée. Le mélange obtenu est agité durant une demi-heure à température ambiante puis filtré et concentré sous pression réduite. Le céto-ester obtenu est trituré avec un mélange 1:1 de $\text{Et}_2\text{O}:\text{hexanes}$ (2x 40 ml) puis mis en suspension dans des xylènes (100 ml). De l'acétate d'ammonium (17,5 g ; 0,23 mol) est ajouté et le mélange est chauffé à reflux pendant environ une heure et demie avec élimination de AcONH_4 en excès et de l'eau libérée par le biais d'un piège de Dean-Stark. Le milieu réactionnel est lavé avec une

solution saturée de NaHCO_3 (50 ml), séché sur Na_2SO_4 , filtré et concentré sous vide pour donner 6,66g (98 %) du produit désiré.

Spec. masse : 486,3 (MH+).

5 **5.i)** 2-(1-(S)-((phénylméthoxy)carbonyl)-amino-2-((2-phénylméthoxy-2-oxo)éthyl)-1-((2-éthoxy-2-oxo)éthyl)-4-(2-méthoxyphényl)-imidazole

L'intermédiaire 5.i est préparé selon une méthode analogue à celle de l'étape 1.c.

Spec. masse : 572,3 MH+.

5.j) acide (6-oxo-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydro-imidazo[1,2-a]pyrazin-8-yl)-acétique

10 L'intermédiaire 5.j est préparé selon une méthode analogue à celle de l'étape 1.d.

Spec. masse : 302,2 MH+.

RMN ^1H (DMSO- d_6) : 8,35-8,5 (1H, d, large) ; 8,0-8,1 (1H, dd) ; 7,45-7,55 (1H, s) ; 7,15-7,25 (1H, m) ; 7,0-7,1 (1H, m) ; 6,9-7,0 (1H, m) ; 4,85-5,0 (1H, s large) ; 4,55-4,75 (2H, q) ; 3,85-3,95 (3H, s) ; 2,8-2,95 (2H, d).

15 **5.k)** 8-hydroxyéthyl-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydro-imidazo[1,2-a]pyrazine

L'intermédiaire 5.k est préparé selon une méthode analogue à celle de l'étape 1.e, excepté le fait qu'une proportion molaire de 6/9 de BH_3 par rapport au substrat est utilisée.

Spec. masse : 274,3 MH+.

20 **5.l)** 7-((1,1-diméthyléthoxy)carbonyl)-8-hydroxyéthyl-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydro-imidazo[1,2-a]pyrazine

L'intermédiaire 5.k (1,36 g ; 5,0 mmol) est mis en suspension dans H_2O (5 ml) et un mélange de di-t-butyl dicarbonate (1,20 g ; 5,5 mmol) dans du p-dioxane (10 ml) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité vigoureusement et maintenu à pH 8,0-8,4 par addition goutte à goutte d'une solution 2,5N de NaOH jusqu'à ce que la réaction soit terminée (suivi de la réaction par CCM sur gel de silice, éluant AcOEt:hexanes 3:2). Le produit brut est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un mélange AcOEt:hexanes 3:2 comme éluant (système Biotage, colonnes pré-remplies 4 x 15 cm). Les fractions contenant le produit sont combinées et concentrées sous vide pour donner une mousse blanche (1,60 g ; 86 %).

30 Spec. masse : 374,3 MH+.

RMN ¹H (DMSO-d₆) : 7,95-8,05 (1H, d,d) ; 7,45-7,55 (1H, s) ; 7,10-7,25 (1H, m) ; 7,0-7,1 (1H, m) ; 6,9-7,05 (1H, m) ; 5,05-5,15 (1H, t) ; 4,25-4,35 (1H, t) ; 4,05-4,2 (1H, s large) ; 4,0-4,1 (1H, m) ; 3,9-4,0 (3H, s) ; 3,9-4,0 (1H, m) ; 3,25-3,35 (2H, m) ; 1,9-2,1 (2H, m) ; 1,15-1,25 (9H, s).

5 **5.m)** 7-(((1,1-diméthyléthoxy)carbonyl)-8-phénoxyéthyl-2-(2-méthoxyphényle)-5,6,7,8-tétrahydro-imidazo[1,2-a]pyrazine

L'intermédiaire 5.l (746 mg ; 2,00 mmol) est dissous dans du THF (10 ml) contenant de la triphénylphosphine (550 mg ; 2,1 mmol) et du phénol (198 mg ; 2,1 mmol). Le mélange est refroidi à 0 °C sous azote et du diéthylazodicarboxylate
10 (330 µl ; 2,1 mmol) est ajouté goutte à goutte durant 10 minutes. Le mélange réactionnel est ensuite agité durant 2 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite refroidi à nouveau à 0 °C et de la triphénylphosphine (275 mg ; 1,05 mmol) et du phénol (99 mg ; 1,05 mmol) sont ajoutés. On ajoute ensuite du diéthylazodicarboxylate (166 µl ; 1,05 mmol) goutte à goutte durant 10 minutes puis le
15 mélange est agité encore pendant 1 heure à température ambiante. Les solvants sont éliminés sous pression réduite et le produit brut est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un mélange AcOEt:hexanes 3:2 comme éluant. Les fractions contenant le produit sont combinées et concentrées sous vide. Après recristallisation dans AcOEt et les hexanes, on obtient le produit désiré sous forme d'un solide blanc
20 (863 mg ; 96 %).

Spec. masse : 450,4 MH⁺.

5.n) 7-(2-(((1,1-diméthyléthoxy)carbonyl)amino)-1-oxo-3-((triphénylméthyle)thio)propyl)-2-(2-méthoxyphényle)-8-(phénoxyéthyle)-4,5,6,7-tétrahydro-imidazo[1,2a]-pipérazine

L'intermédiaire 5.m (850 mg ; 1,89 mmol) est traité avec un mélange de TFA (10 ml) contenant iPr₃SiH (387 µl, 1.89 mmol) à température ambiante pendant 20 min. Les solvants sont éliminés sous pression réduite et le produit brut est réparti entre AcOEt (15 ml) et une solution saturée de NaHCO₃ (15 ml). La phase AcOEt est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le produit déprotégé est couplé à
30 Boc-(L)-Cys(Trt)-OH selon une méthode analogue à celle de l'étape 1.f (1,26 g ; 84 %).

**5.o) 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénoxyéthyl)-
4,5,6,7-tétrahydro-imidazo-[1,2a]-pipérazine**

Le produit **5** est préparé à partir de l'intermédiaire 5.n selon une méthode analogue à celle de l'étape 1.g.

5 Spec. masse : 274,3 MH+.

RMN ¹H (DMSO-d6 à 90 °C) : 8,5-9,2 (3H, s, large) ; 7,95-8,1 (1H, d) ;
7,85-8,0 (1H, s) ; 7,35-7,5 (1H, m) ; 7,15-7,35 (3H, m) ; 7,0-7,15 (1H, t) ;
6,85-7,0 (3H, m) ; 5,9-6,1 (1H, s, large) ; 4,5-4,8 (2H, m, large) ; 4,15-4,45 (3H, m,
large) ; 3,9-4,0 (3H, s) ; 3,75-4,0 (1H, m, large) ; 2,8-3,05 (2H, m, large) ;
10 2,55-2,75 (2H, m, large).

**Exemple 6 : 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-
8-(phénoxyéthyl)-5,6,7,8-tétrahydro-imidazo[1,2a]pyrazine,
dimère : 6 :**

Le composé 5.o (467 mg ; 0,687 mmol) est mis en solution dans H₂O (25 ml) et le
15 pH de la solution est ajusté à 7,2 par addition d'une solution aqueuse diluée de NH₄OH.
De l'acétonitrile est ajouté pour donner une solution limpide et le mélange est agité à
température ambiante durant une nuit. Le produit brut est purifié par HPLC préparative
sur une colonne C18 en utilisant un gradient de 15 à 40 % CH₃CN dans du TFA à
0,1 % sur une durée de 50 minutes. Les fractions pures de produit sont rassemblées et
20 lyophilisées. Le produit initial est lyophilisé par deux fois à partir d'une solution diluée de
HCl pour donner le produit sous forme de son chlorhydrate (161 mg ; 45 %).

Spec. masse : 903,5 MH+.

RMN ¹H (DMSO-d6 à 90° C) : 8,7-9,3 (3H, s large) ; 7,95-8,1 (1H, d) ;
7,85-8,0 (1H, s) ; 7,3-7,5 (1H, t) ; 7,1-7,3 (3H, m) ; 7,0-7,15 (1H, t) ;
25 6,8-7,0 (3H, m) ; 5,85-6,1 (1H, s large) ; 4,7-4,9 (1H, s large) ; 4,45-4,7 (1H, m
large) ; 4,1-4,5 (4H, m large) ; 3,85-4,0 (4H, s) ; 3,3-3,5 (2H, m large) ;
2,5-2,8 (2H, m large).

Exemple 7 : 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénylesulfonyléthyl)-5,6,7,8-tétrahydro-imidazo[1,2a]pyrazine : 7 :

Le composé 7 a été préparé selon le schéma synthétique ci-dessous :

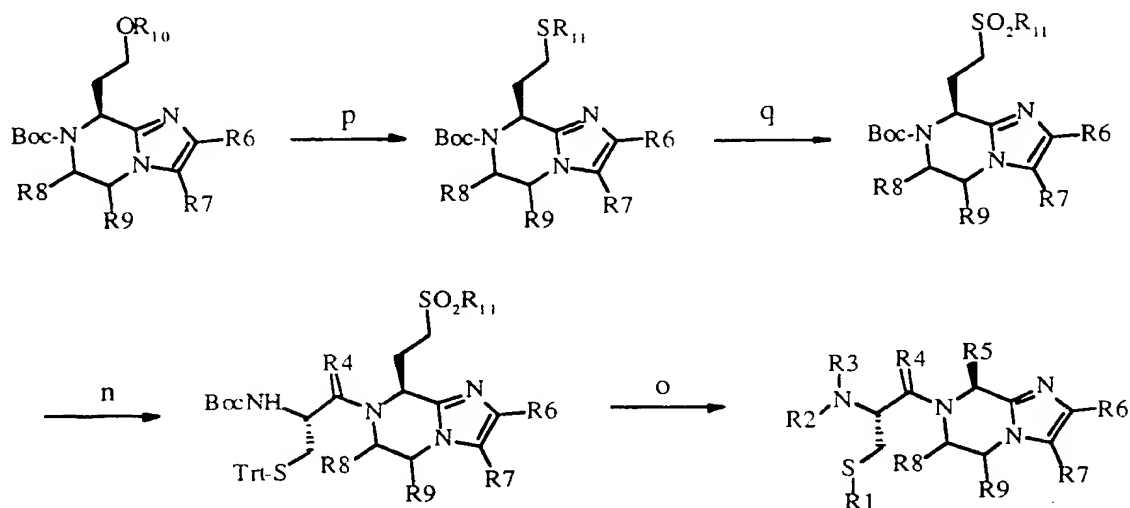


Schéma 3

- 5 **7.p)** 7-((1,1-diméthyléthoxy)carbonyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénylthioéthyl)-5,6,7,8-tétrahydro-imidazo[1,2-a]pyrazine

De l'intermédiaire 5.1 (1,23 g ; 3,30 mmol), de la tri-n-butylphosphine (1,64 ml ; 6,60 mmol), et du phényldisulfide (1,44 g ; 6,60 mmol) sont mélangés dans du THF (10 ml). Le mélange est agité à température ambiante sous argon durant
10 4 heures. Les solvants sont éliminés sous pression réduite et le produit brut est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un mélange AcOEt:hexanes 1:1 comme éluant. Les fractions contenant le produit sont combinées et concentrées sous vide pour donner le produit sous forme d'une mousse blanche (1,43 g ; 93 %).
Spec. masse : 466,3 MH+.

- 15 **7.q)** 7-((1,1-diméthyléthoxy)carbonyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénylesulfonyléthyl)-5,6,7,8-tétrahydro-imidazo[1,2-a]pyrazine

L'intermédiaire 7.p (650 mg ; 1,40 mmol) est dissous dans du CH₂Cl₂ (10 ml) et de l'acide 3-chloroperoxybenzoïque (483 mg ; 2,80 mmol) est ajouté en plusieurs portions sur une période de 10 minutes. Le mélange est versé sur une colonne de silice et
20 élué avec un mélange hexanes:AcOEt 7:3, puis un mélange hexanes:AcOEt 1:1 pour donner le produit pur (220 mg ; 32 %).

Spec. masse : 498,3 MH+.

RMN ^1H (DMSO- d_6 à 30 °C) : 7,9-8,0 (3H, m) ; 7,7-7,85 (1H, m) ; 7,6-7,75 (2H, m) ; 7,45-7,55 (1H, s) ; 7,15-7,25 (1H, m) ; 6,9-7,1 (2H, m) ; 5,1-5,25 (1H, t) ; 4,1-4,3 (1H, d large) ; 4,0-4,15 (1H, m) ; 3,8-4,0 (1H, m) ; 3,85-3,95 (3H, s) ;
5 3,6-3,8 (1H, m) ; 3,4-3,6 (1H, m) ; 3,2-3,4 (H_2O plus un signal flou) ; 1,9-2,3 (2H, m) ; 1,3-1,5 (9H, s).

Etape 7.n)

L'étape 7.n est réalisée selon une méthode analogue à l'étape 5.n. Le produit brut est engagé sans purification complémentaire dans l'étape suivante.

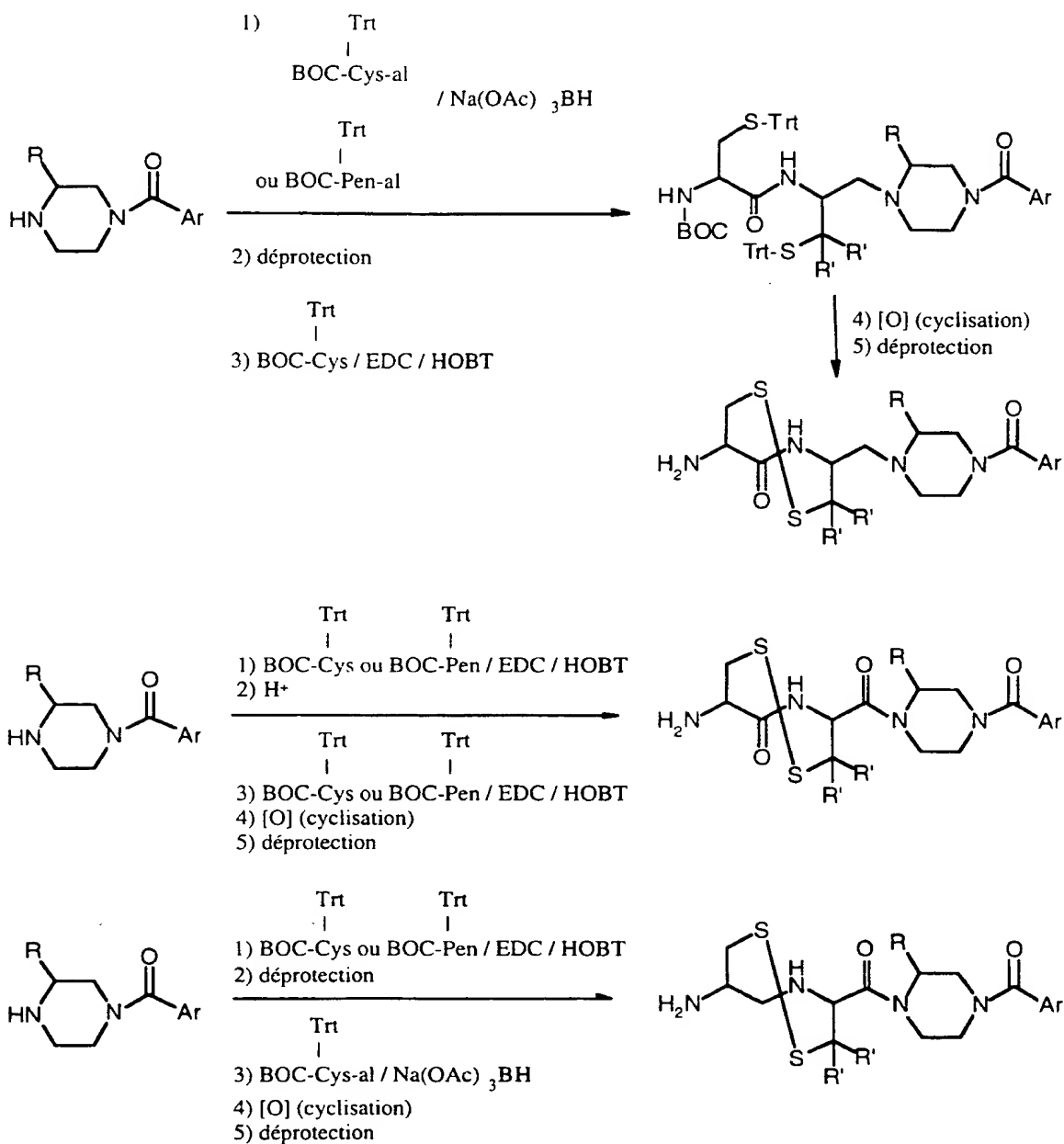
10 **Etape 7.o)**

L'étape 7.o est réalisée selon une méthode analogue à l'étape 5.o.

Spec. masse : 501,3 MH+.

Préparation du composé de formule (VII):

Ce composé, proche de ceux décrits dans la demande de brevet PCT WO 97/30053, peut être préparé selon le schéma synthétique suivant :



$\text{R}' = \text{H}$ ou CH_3 ;

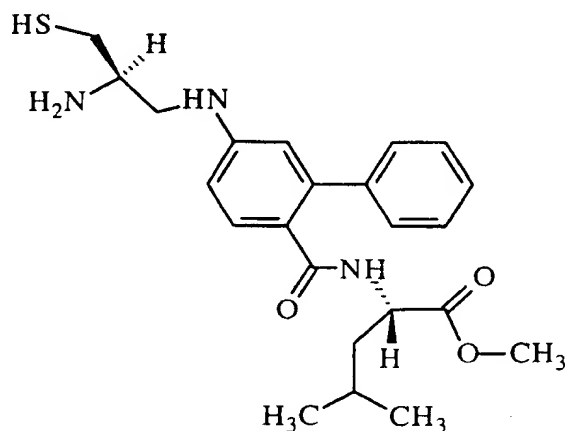
Cys = Cystéine, Cys-al = Cystéinal;

Pen = Pénicillamine, Pen-al = Pénicillaminyal

PARTIE PHARMACOLOGIQUE

Afin d'illustrer l'utilité de l'invention, on étudiera l'effet d'un traitement d'une lignée de cellules humaines MCF-7 par les composés suivants :

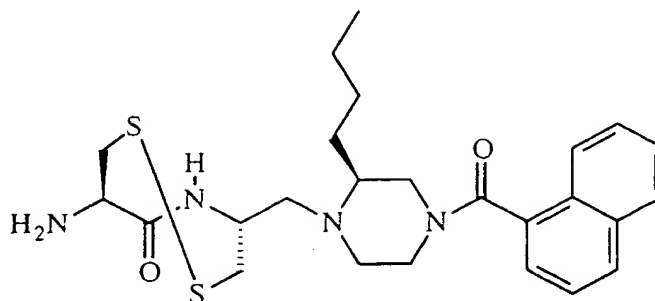
- 5 - disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine, désigné dans cette partie comme composé (I) ;
- disulfure de bis-1,1'-7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-(2-(1-naphtyl)-8-(2-méthylpropyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazin-7-yle), désigné dans cette partie comme composé (II) ;
- 10 - 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthylphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine, désigné dans cette partie comme composé (III) ;
- le composé de formule :



désigné dans cette partie comme composé (IV) ;

- 15 - la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-butyl-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine, désigné dans cette partie comme composé (V) ;
- le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(méthoxyphényl)-8-(1-méthylpropyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine], désigné dans cette
- 20 partie comme composé (VI) ;

- le composé de formule :



désigné dans cette partie comme composé (VII) ;

Procédures

Lignée cellulaire

- 5 Les lignées cellulaires MCF-7 (cellules pleurales humaines, cancer du sein) ont été acquises auprès de American Tissue Culture Collection (Rockville, Maryland, USA).

Mesure de la quantité intracellulaire d'AMP cyclique pour les cellules MCF-7

- Des cellules MCF-7 (2.10^4 cellules/puits) ensemencées en plaques de 24 puits, sont mises en culture durant 5 jours dans le milieu de Eagle modifié par Dulbecco (Gibco-Brl, Cergy-Pontoise, France) complété avec 10% de sérum foetal de veau inactivé par chauffage (Gibco-Brl, Cergy-Pontoise, France), 50000 unités/l de pénicilline et 50 mg/l streptomycine (Gibco-Brl, Cergy-Pontoise, France), et 2 mM de glutamine (Gibco-Brl, Cergy-Pontoise, France). Le milieu de culture est remplacé après deux lavages avec un milieu sans sérum complété ou non avec les agents spécifiés pour un temps indiqué dans les différentes figures. Des agents activant la production d'AMP cyclique sont ensuite ajoutés à 37 °C. La réaction est stoppée au bout de 30 minutes par suppression du milieu et addition rapide de 100 µl de solution HCl 0,1N. Ces extraits sont congelés à -80 °C jusqu'à ce qu'ils soient utilisés. La concentration d'AMPc est mesurée en utilisant un kit commercial de mesure (référence NEK033 de NEN, Les Ulis, France) en suivant les instructions du fabricant. La radioactivité est déterminée par un compteur Gamma (Gamma Master-1277, LKB, Turku, Finland).

Mesure de la prolifération cellulaire in vitro

- Les cellules MCF-7 (3000 cellules/puits) sont cultivées en plaques 96 puits dans 80 µl de milieu de Eagle modifié par Dulbecco (Gibco-Brl, Cergy-Pontoise, France) complété avec 10% de sérum foetal de veau inactivé par chauffage (Gibco-Brl, Cergy-Pontoise, France), 50000 unités/l de pénicilline et 50 mg/l streptomycine (Gibco-Brl,

Cergy-Pontoise, France), et 2 mM de glutamine (Gibco-Brl, Cergy-Pontoise, France) ont été ensemencées sur une plaque de 96 puits au jour 0. Les cellules ont été traitées au jour 1 pendant 96 heures avec des concentrations croissantes allant jusqu'à 50 μ M de chacun des composés à tester. A la fin de cette période, la quantification de la prolifération cellulaire est évaluée par test colorimétrique en se basant sur le clivage du sel de tétrazolium WST1 par les déhydrogénases mitochondriales dans les cellules viables conduisant à la formation de formazan (Boehringer Mannheim, Meylan, France). Ces tests sont effectués en double avec 8 déterminations par concentration testée. Pour chaque composé à tester, les valeurs incluses dans la partie linéaire de la sigmoïde ont été retenues pour une analyse en régression linéaire et utilisées pour estimer la concentration inhibitrice (CI₅₀).

Mesure de l'activité de la MAP kinase

Des cellules MCF7 (5.105 cellules/puits) sont cultivées en plaques 6 puits dans le milieu de Eagle modifié par Dulbecco (Gibco-Brl, Cergy-Pontoise, France) complété avec 10 % de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur (Gibco-Brl, Cergy-Pontoise, France), un mélange d'antibiotiques : 50000 unités/l de pénicilline et 50 mg/l de streptomycine (Gibco-Brl, Cergy-Pontoise, France) et 2 mM de glutamine (Gibco-Brl, Cergy-Pontoise, France). Après 24 heures de culture, les cellules sont incubées pendant 48 heures dans du milieu ne contenant pas de sérum pour amener les cellules à l'état de repos. Les cellules sont alors traitées pendant 1 heure soit par le composé I soit par le PD98059 (Calbiochem, France Biochem, Meudon, France), un inhibiteur spécifique de l'activation de la MAP kinase. Les cellules sont ensuite stimulées (ou non) pendant 5 minutes par 12.5 ng/ml de facteur de croissance épidermique (EGF). La réaction est stoppée par deux lavages avec du PBS (Gibco-Brl, Cergy-Pontoise, France), à 4° C ne contenant ni calcium ni magnésium et par addition de 150 μ l de tampon de lyse à 4° C dont la composition est la suivante: 10 mM de tris, 150 mM de NaCl, 2 mM d'EGTA, 2 mM de dithiothreitol, 1 mM de PMSF, 2 mM d'orthovanadate, 10 μ g/ml de leupeptine et 10 μ g/ml d'aprotinine. Un dosage des protéines contenues dans les extraits est réalisé par la méthode de Bradford (réactifs Biorad, Ivry-Sur-Seine, France). Ces extraits sont congelés à -80 °C jusqu'à ce qu'ils soient utilisés. L'activité de la MAP kinase est mesurée à l'aide d'un kit commercial de mesure (référence RPN 84, Amersham, Life Science, Les Ulis, France) en suivant les instructions du fabricant. La radioactivité est déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation Packard (Tricarb 5000CA).

Matériel

Le peptide vaso-intestinal (VIP) a été acquis chez Bachem (Voisins le Bretonneux, France). La toxine cholérique, la forskoline, l'isoprotérénol, la prostaglandine E2 et le PD 98059 ont été acquis chez Calbiochem (France Biochem, Meudon, France). Les

composés de formules (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) et (VII) ont été fournis par Biomeasure Inc. (Milford, MA, USA). Tous ces composés ont été utilisés en suivant les recommandations de leurs fabricants.

Résultats

- 5 La figure 1 montre que l'activation de l'adénylate cyclase par la toxine cholérique (200 ng/ml) ou par la forskoline (10 μ M) conduit à une élévation très importante du taux d'AMP cyclique. Un prétraitement des cellules pendant 30 minutes avec 30 μ M de composé (I) ne modifie pas la production d'AMP cyclique induite par l'activateur direct de l'adénylate cyclase, la forskoline. En revanche, la production d'AMP cyclique
10 stimulée par l'activateur direct de la sous-unité, la toxine cholérique, est fortement inhibée par le composé (I). Ceci montre que l'adénylate cyclase, elle-même, n'est pas modifiée par le composé (I) et que celui-ci empêche la formation du complexe hétérotrimérique.

- Le VIP a été présenté comme un ligand extra-cellulaire d'un récepteur couplé à la protéine G qui stimule la synthèse d'AMP cyclique dans des cellules humaines de cancer
15 du sein. La figure 2 montre que le traitement par le VIP de cellules humaines de cancer du sein MCF-7 augmente la quantité intracellulaire d'AMP cyclique de façon concentration-dépendante. La concentration de VIP de 10 nM qui offre une production d'AMP cyclique quasi-optimale sera utilisée pour les tests suivants. Cette concentration est en accord avec les données déjà publiées concernant la lignée de cellules humaines de
20 cancer du sein T47D.

- La figure 3 montre qu'un prétraitement de 30 minutes des cellules MCF-7 issues de cultures *in vitro* par le composé de formule (I) est suffisant pour inhiber de façon dépendante de la concentration, l'accumulation d'AMP cyclique stimulée par le VIP. Une inhibition presque complète a été obtenue à une concentration de 100 μ M du composé de
25 formule (I). Ces résultats montrent qu'un traitement par le composé (I) est suffisant pour bloquer la transduction du signal dont la voie utilise les protéines G hétérotrimériques comme médiateurs.

- La figure 4 montre qu'un traitement d'une heure par le composé de formule (I) est suffisant pour modifier la réponse au VIP. Des traitements d'une durée plus longue
30 (8 heures et 24 heures) continuent d'inhiber la production d'AMP cyclique mais le principal effet est obtenu très rapidement.

Le composé (I) est aussi capable d'inhiber la formation d'AMP cyclique induite par d'autres agents qui stimulent les récepteurs à sept domaines transmembranaires. Dans les cellules MCF7, par exemple, l'activité de l'adénylate cyclase très fortement augmentée

par la prostaglandine E₂ est inhibée par un traitement de 30 minutes par le composé (I). Ceci suggère que le traitement des cellules par le composé (I) modifie la forme hétérotrimérique des protéines G en dissociant la sous-unité du dimère β/γ .

5 L'inhibition de la stimulation par le VIP n'est pas restreinte à des composés de structure analogue à celle du composé de formule (I). Comme le montre le tableau I, les composés (II), (III), (IV), (V), (VI) et (VII) testés dans le même modèle, sont aussi capables de réduire la quantité d'AMP cyclique induite par le VIP.

10 L'ensemble de ces résultats suggèrent que les composés testés modulent l'activité de l'adénylate cyclase en modifiant la forme hétérotrimérique des protéines G. Or, on sait que les dimères β/γ peuvent activer directement des effecteurs conduisant à l'activation de kinases régulées par des signaux extracellulaires (ERKs) ou MAP kinases.

15 La figure 6 montre qu'un traitement des cellules pendant 1 heure par le composé (I) double l'activité basale de la MAP kinase. Ceci suggère qu'en empêchant la formation du complexe hétérotrimérique, le composé (I) libère l'hétérodimère - qui, lui, reste lié à la membrane et active la voie de ras. En revanche, la figure 7 montre qu'après une stimulation de 5 minutes de la MAP kinase par le facteur de croissance EGF, l'activité de l'enzyme est augmentée d'environ 7 fois. Un pré-traitement pendant 1 heure des cellules soit par le composé (I) soit par le PD98059, un inhibiteur spécifique de l'activation de la MAP kinase, réduit de 2 fois l'activité de la MAP kinase. Ces résultats suggèrent que le
20 composé (I) stimule à l'état basal la voie de ras et inhibe cette même voie si celle-ci est stimulée expliquant ainsi son effet antiprolifératif.

Le tableau II montre en effet que les composés (I), (II), (III) et (IV) sont capables d'inhiber la prolifération *in vitro* des cellules tumorales humaines MCF7.

| Composé | Inhibition à 30 μ M |
|---------|-------------------------|
| (I) | 86 % |
| (II) | 71 % |
| (III) | 59 % |
| (IV) | 52 % |
| (V) | 68 % |
| (VI) | 52 % |
| (VII) | 65 % |

Tableau I

Effets des composés I, II, III et IV incubés pendant 30 minutes sur la production d'AMP cyclique stimulée par le VIP dans les cellules MCF7.

Les cellules sont incubées pendant 30 minutes en présence ou non des composés I, II, III et IV (30 μ M) qui sont stimulées ensuite par 10^{-8} M de VIP. La quantification d'AMP cyclique est déterminée par dosage radio-immunologique. Les données représentent la moyenne \pm ESM (n=5 pour le témoin et n=1 pour les différents composés).

| Composé testé | CI ₅₀ (μ M) |
|---------------|-----------------------------|
| composé I | 9,4 |
| composé II | 15,0 |
| composé III | 16,1 |
| composé IV | 34,6 |

Tableau II

Inhibition de la croissance *in vitro* des cellules MCF7 par les composés I, II, III et IV.

Les résultats des CI₅₀ sont exprimés en μ M et représentent la moyenne de 2 expériences.

FIGURES

Figure 1 : Effet du composé I sur la production d'AMP cyclique stimulée par la toxine cholérique ou la forskoline dans les cellules MCF7

Les cellules sont incubées pendant 30 minutes en présence ou non du composé I (30 μ M) et stimulées ensuite soit par la toxine cholérique (200 ng/ml) pendant 90 minutes soit par la forskoline (10^{-5} M) pendant 30 minutes. La quantification d'AMP cyclique est déterminée par dosage radio-immunologique. Les données représentent la moyenne \pm ESM (n=3)

Figure 2 : Effet de concentrations croissantes de VIP sur la production d'AMP cyclique dans les cellules MCF7

Les cellules sont stimulées pendant 30 minutes par le VIP aux concentrations indiquées. La quantification d'AMP cyclique est déterminée par dosage radio-immunologique.

Figure 3 : Effet de différentes concentrations de composé I sur la production d'AMP cyclique stimulée par le VIP dans les cellules MCF7

Les cellules sont incubées pendant 24 heures en présence de concentrations croissantes du composé I et stimulées ensuite pendant 30 minutes par 10^{-8} M de VIP. La quantification d'AMP cyclique est déterminée par dosage radio-immunologique. Les données représentent la moyenne \pm ESM (n = 3).

Figure 4 : Effet du temps d'incubation des cellules MCF7 en présence du composé I sur la production d'AMP cyclique stimulée par le VIP

Les cellules sont incubées pendant 1, 8 ou 24 heures en présence ou non du composé I (30 μ M) et stimulées ensuite par 10^{-8} M de VIP. La quantification d'AMP cyclique est déterminée par dosage radio-immunologique. Les données représentent la moyenne \pm ESM (n=1).

Figure 5 : Effet du composé I sur la production d'AMP cyclique stimulée par le VIP, l'isoprotérénol ou la prostaglandine E₂ dans les cellules MCF7

Les cellules sont incubées pendant 30 minutes en présence ou non du composé I (30 μ M) et stimulées ensuite pendant 30 minutes soit par le VIP (10^{-8} M), soit par l'isoprotérénol (10^{-6} M), soit par la PGE₂ (10^{-6} M). La quantification d'AMP cyclique est

déterminée par dosage radio-immunologique. Les données représentent la moyenne \pm ESM (n = 3).

Figure 6 : Effet du composé I sur l'activité basale de la MAP kinase dans les cellules MCF7.

- 5 Les cellules, privées en sérum pendant 48 heures sont traitées pendant 1 heure par le composé I (10 et 50 μ M). L'activité de la MAP kinase est déterminée dans les lysats cellulaires et est exprimée en pmole de Pi incorporé / minute / 4 μ g de protéine.(n = 3 pour les échantillons témoins et n = 2 pour les cellules traitées par le composé I).

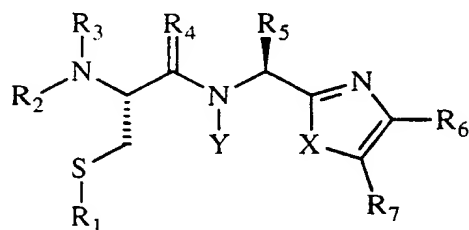
10 **Figure 7 : Effet du composé I comparé au PD98059 sur l'activité de la MAP kinase dans les cellules MCF7.**

- Les cellules, privées en sérum pendant 48 heures sont traitées pendant 1 heure soit par le composé I (10 et 50 μ M) soit par le PD98059 (10 et 50 μ M). Les cellules sont ensuite stimulées par l'addition d'EGF (12,5 ng/ml) pendant 5 minutes. L'activité de la MAP kinase est déterminée dans les lysats cellulaires et est exprimée en pmole de
- 15 Pi incorporé / minute / 4 μ g de protéine.(n = 4).

REVENDICATIONS

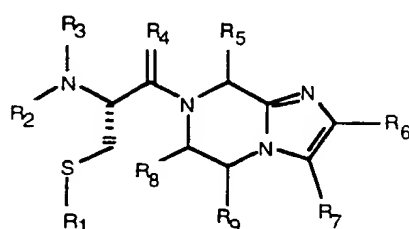
1. Utilisation d'un dérivé de cystéine, choisi parmi le groupe composé :

- d'un composé de formule générale (A) :

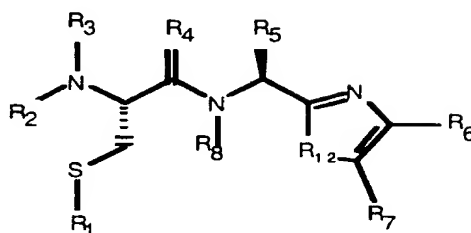


(A)

correspondant aux sous-formules (A1) ou (A2) :



(A1)



(A2)

5 dans lesquelles :

X représente R_{12} et Y représente R_8 , ou X et Y complètent un cycle à 6 chaînons, l'ensemble X-Y représentant le radical $-\text{CH}(R_8)-\text{CH}(R_9)-$;

R_1 représente H, un radical alkyle ou alkylethio inférieur ;

R_2 et R_3 représentent indépendamment H ou un radical alkyle inférieur ;

10 R_4 représente H_2 ou O ;

R_5 représente H, ou l'un des radicaux alkyle inférieur, alkényle inférieur, alkynyle inférieur, aryle, arylalkyle inférieur, hétérocycle ou hétérocycle alkyle inférieur, ces radicaux pouvant éventuellement être substitués par des radicaux choisis parmi le groupe composé d'un radical alkyle inférieur, $-\text{O}-R_{10}$, $-\text{S}(\text{O})_m R_{10}$ (m représentant 0, 1, ou 2),

-N(R₁₀)(R₁₁), -N-C(O)-R₁₀, -NH-(SO₂)-R₁₀, -CO₂-R₁₀, C(O)-N(R₁₀)(R₁₁), et -(SO₂)-N(R₁₀)(R₁₁) ;

R₆ et R₇ représentent indépendamment H, un radical -C(O)-NH-CHR₁₃-CO₂R₁₄, ou l'un des radicaux alkyle inférieur, aryle, arylalkyle inférieur, hétérocycle ou hétérocycle alkyle inférieur, ces radicaux pouvant éventuellement être substitués par des radicaux choisis parmi le groupe composé des radicaux OH, alkyle ou alkoxy inférieur, N(R₁₀)(R₁₁), COOH, CON(R₁₀)(R₁₁), et halo, ou R₆ et R₇ forment ensemble un radical aryle ou un hétérocycle ;

R₈ et R₉ représentent indépendamment, H, ou l'un des radicaux alkyle inférieur, aryle, arylalkyle inférieur, hétérocycle ou hétérocycle alkyle inférieur, ces radicaux pouvant éventuellement être substitués par des radicaux choisis parmi le groupe composé des radicaux OH, alkyle ou alkoxy inférieur, N(R₁₀)(R₁₁), COOH, CON(R₁₀)(R₁₁) et halo, ou R₈ et R₉ forment ensemble un radical aryle ou un hétérocycle ;

R₁₀ et R₁₁, représentent indépendamment H, un radical aryle ou hétérocycle, ou un radical alkyle, arylalkyle ou hétérocycle alkyle inférieur ;

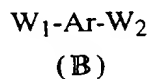
R₁₂ représente NR₉, S, ou O ;

R₁₃ représente un radical alkyle inférieur éventuellement substitué par un radical choisi parmi les radicaux alkyle inférieur, -OR₁₀, -S(O)_mR₁₀ (m représentant 0, 1, ou 2) et -N(R₁₀)(R₁₁) ;

R₁₄ représente H ou un radical alkyle inférieur ;

étant entendu que les composés de formule générale (A) peuvent également se présenter sous forme de dimères, lorsque deux radicaux R₁ représentant chacun un atome d'hydrogène sont éliminés par oxydation ;

- d'un composé de formule générale (B)



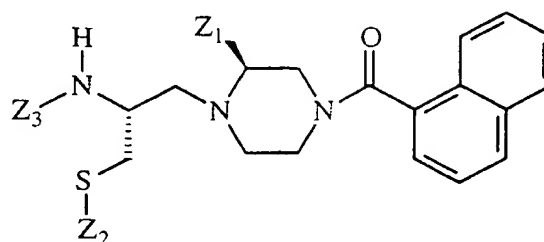
dans laquelle :

W₁ représente un reste issu d'une cystéine sous forme réduite ou non réduite ;

Ar représente un radical dérivé d'un acide aminobenzoïque dont le noyau aromatique est éventuellement substitué ;

W_2 représente un acide aminé, de préférence un acide aminé aliphatique ;

- d'un composé de formule générale (C) :



(C)

dans laquelle :

Z_1 représente un radical alkyle inférieur ;

- 5 Z_2 et Z_3 représentent tous deux H ou bien Z_2 et Z_3 forment ensemble une chaîne ayant de 2 à 4 éléments choisis parmi les radicaux $-C(O)-$, $-CH_2-$, $-CH(NH_2)-$ et $-S-$, étant entendu que deux éléments successifs ne sont pas tous deux $-C(O)-$;

- étant entendu que les composés de formule générale (C) peuvent également se présenter sous forme de dimères, lorsque le radical Z_2 représente un atome d'hydrogène pouvant être éliminé par oxydation ;
- 10

- et d'un sel pharmaceutiquement acceptable d'un composé de formule générale (A), (B) ou (C) ;

pour préparer un médicament destiné à traiter des pathologies qui résultent de la formation de la protéine G hétérotrimérique.

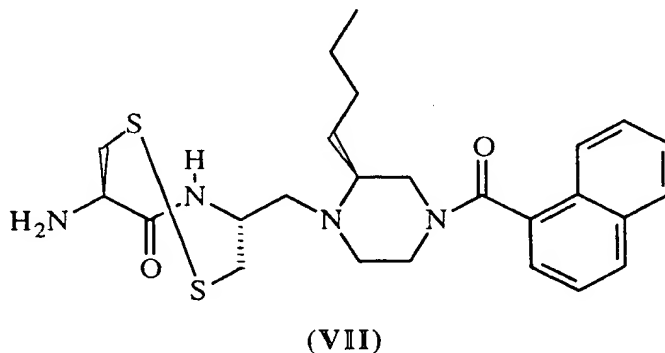
- 15 2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé utilisé est :

- soit un composé de formule générale (A) tel que défini dans la revendication 1 ;

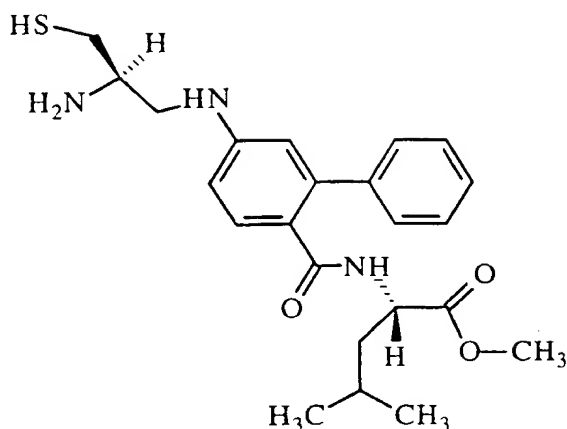
- soit un composé de formule générale (B) pour lequel Ar représente un radical dérivé d'un acide aminobenzoïque dont le noyau aromatique est substitué par un radical phényle et W_1 représente un acide aminé aliphatique ;

3. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé utilisé est choisi parmi l'un des composés suivants :

- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthylphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- 5 - la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-butyl-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(1-méthylpropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 1-[2(R)-amino-3-mercaptopropyl]-2(S)-n-butyl-4-(1-naphtoyl)pipérazine ;
- 10 - le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(méthoxyphényl)-8-(1-méthylpropyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine] ;
- le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine] ;
- le disulfure de bis-1,1'-7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(1-naphtyl)-8-(2-méthylpropyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazin-7-yle) ;
- 15 - le composé de formule :



- le composé de formule :



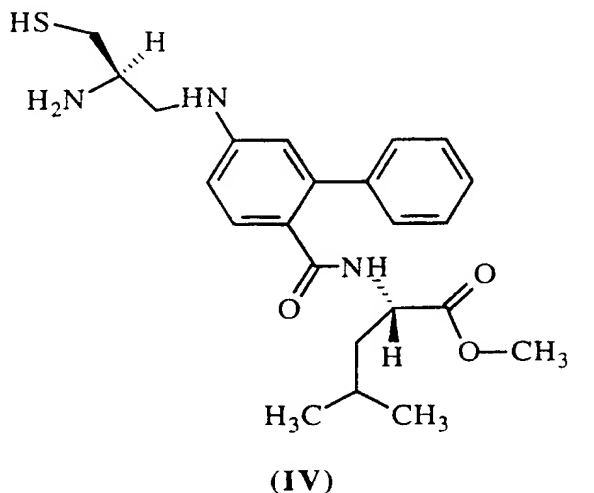
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-phényl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- 5 - la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénylméthoxy)méthyl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(1-phénylméthoxy)éthyl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénoxyéthyl)-
- 10 5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénoxyéthyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine, ou sa forme dimérique ;
- et la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénylsulfonyléthyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- 15 - ou un sel pharmaceutiquement acceptable d'un de ces derniers.

4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que le composé utilisé est choisi parmi l'un des composés suivants :

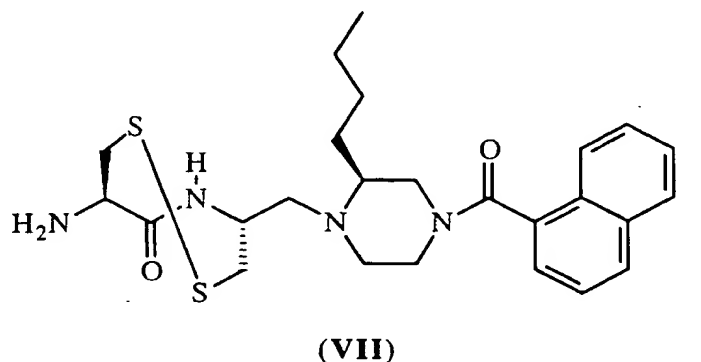
- le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine (I) ;
- 20 - le disulfure de bis-1,1'-7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-(2-(1-naphtyl)-8-(2-méthylpropyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazin-7-yle) (II) ;

- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthylphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine (III) ;

- le composé de formule :



- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-butyl-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine (V) ;
- le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(méthoxyphényl)-8-(1-méthylpropyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine] (VI) ;
- le composé de formule :



- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-phényl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(1-méthylpropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

- la 1-[2(R)-amino-3-mercaptopropyl]-2(S)-n-butyl-4-(1-naphtoyl)pipérazine ;

- ou un sel pharmaceutiquement acceptable d'un de ces derniers.

5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que le composé utilisé est choisi parmi l'un des composés suivants :

5 - le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine (I) ;

- le disulfure de bis-1,1'-7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-(2-(1-naphtyl)-8-(2-méthylpropyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazin-7-yle) (II) ;

- ou un sel pharmaceutiquement acceptable d'un de ces derniers.

10 6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la pathologie à traiter est choisie parmi des pathologies liées aux fonctions biologiques ou désordres suivants : odorat, goût, perception de la lumière, neurotransmission, neurodégénérescence, fonctionnement des glandes endocrines et exocrines, régulation autocrine et paracrine, tension artérielle, embryogénèse, infection virale, fonctions
15 immunologiques, diabète et obésité.

7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la pathologie à traiter est choisie parmi les pathologies suivantes : le choléra, le Syndrome Immuno-Déficitaire Acquis (SIDA), la diarrhée du voyageur et la puberté précoce familiale masculine.

20 8. Produit caractérisé en ce qu'il s'agit d'un des composés suivants :

- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-(2-méthylphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;

- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylméthyl)-2-phényl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;

25 - la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénylméthoxy)méthyl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;

- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(1-phénylméthoxy)éthyl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;

- la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénoxyéthyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine ;
 - la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénoxyéthyl)-5,6,7,8-tétrahydro-imidazo[1,2a]pyrazine, ou sa forme dimérique ;
 - 5 - et la 7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(2-méthoxyphényl)-8-(phénylesulfonylethyl)-5,6,7,8-tétrahydro-imidazo[1,2a]pyrazine.
9. A titre de médicament, un produit selon la revendication 8 ou un sel pharmaceutiquement acceptable de ce produit.
- 10 10. Composition pharmaceutique comprenant à titre de principe actif un produit selon la revendication 7 ou un sel pharmaceutiquement acceptable de ce produit.
11. Utilisation d'un produit selon la revendication 8 pour fabriquer un médicament pour préparer un médicament destiné à traiter des pathologies qui résultent de la formation de la protéine G hétérotrimérique.
- 15 12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que la pathologie est liée à l'une des fonctions biologiques ou désordres suivants : odorat, goût, perception de la lumière, neurotransmission, neurodégénérescence, fonctionnement des glandes endocrines et exocrines, régulation autocrine et paracrine, tension artérielle, embryogénèse, prolifération cellulaire bénigne, oncogénèse, infection virale, fonctions immunologiques, diabète, obésité, et maladies prolifératives bénignes et malignes.

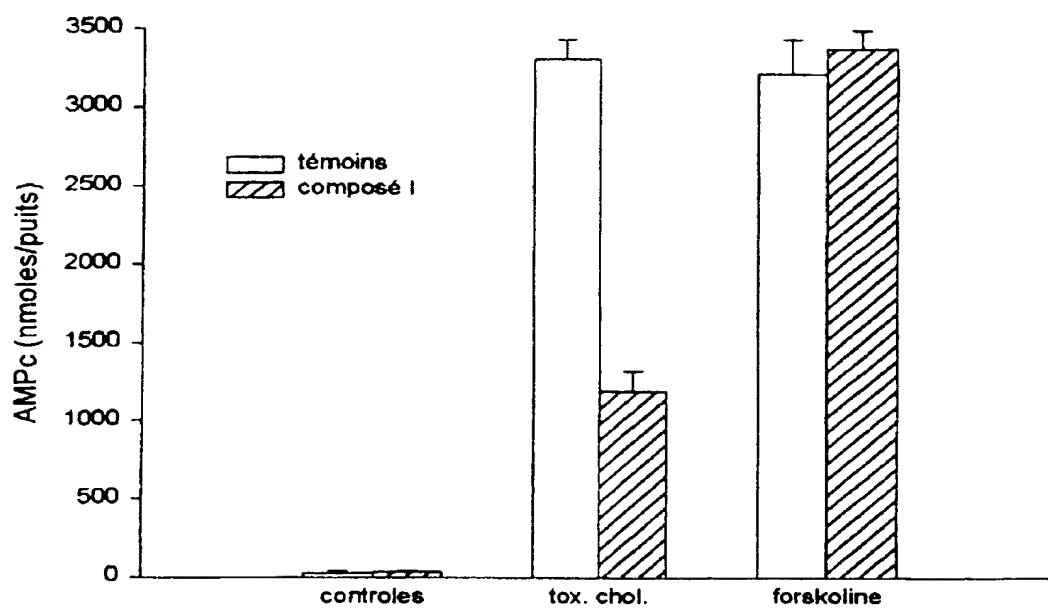


Figure 1

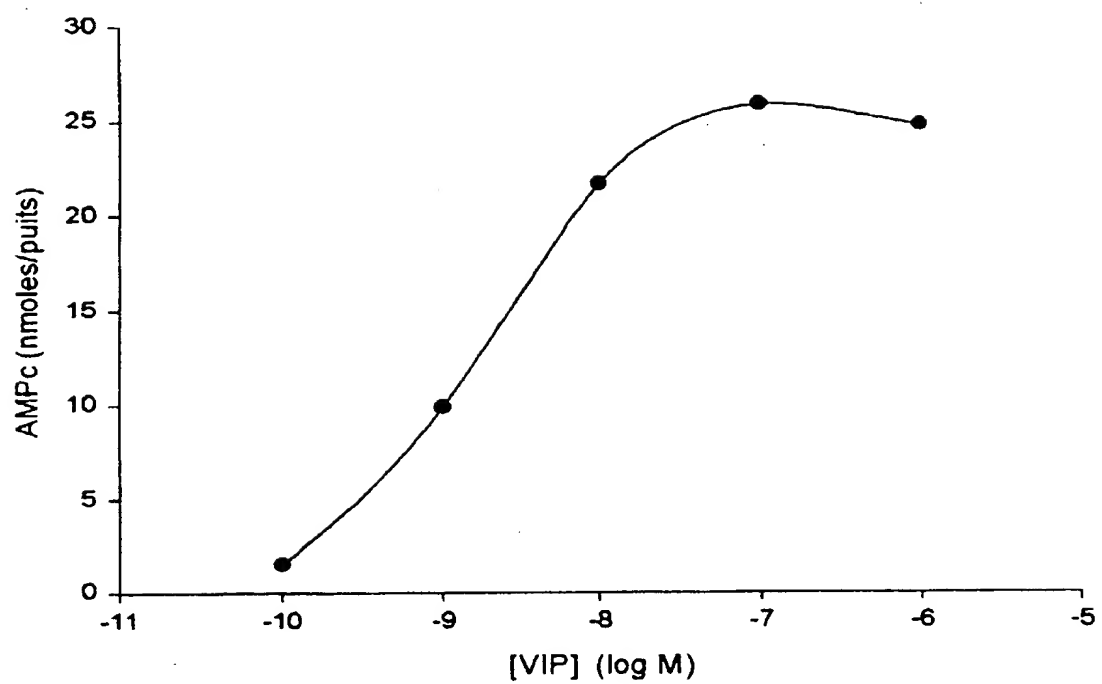


Figure 2

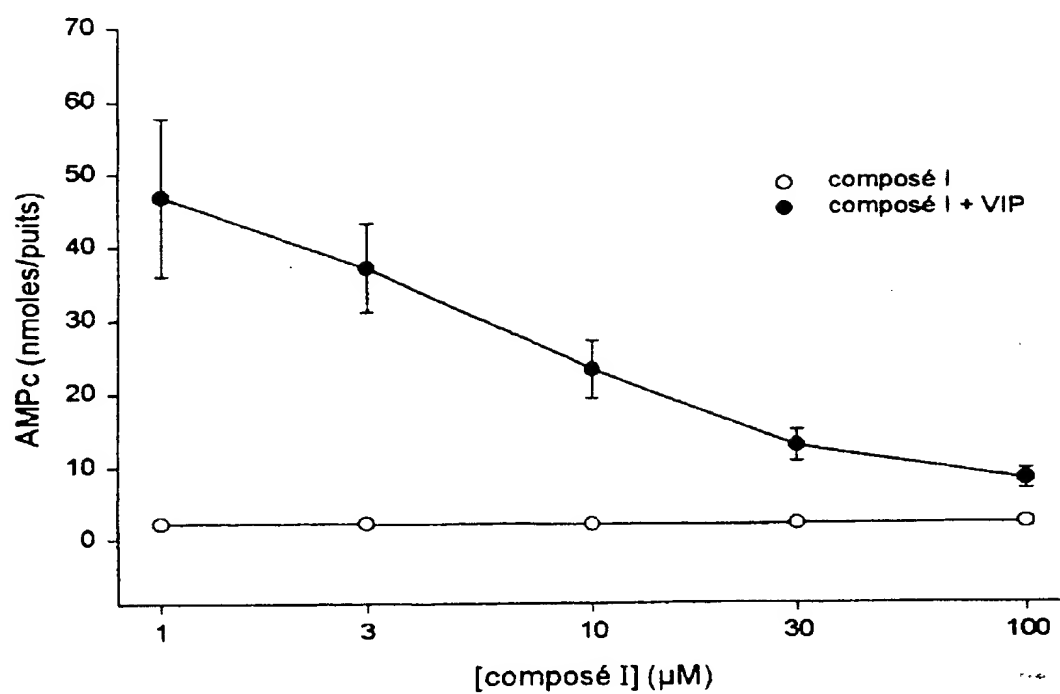


Figure 3

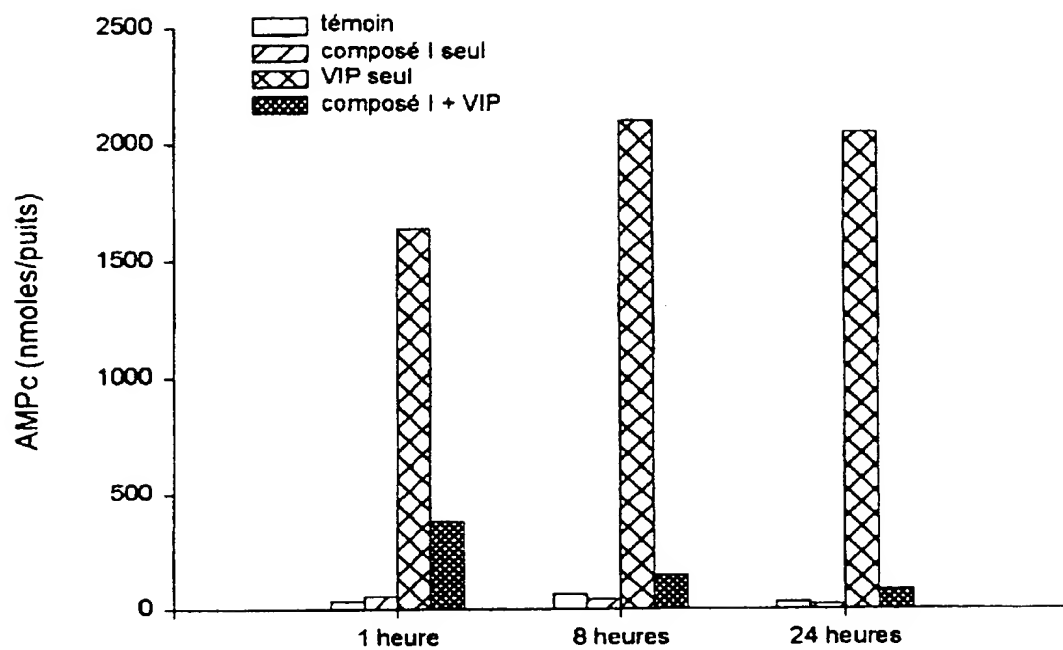


Figure 4

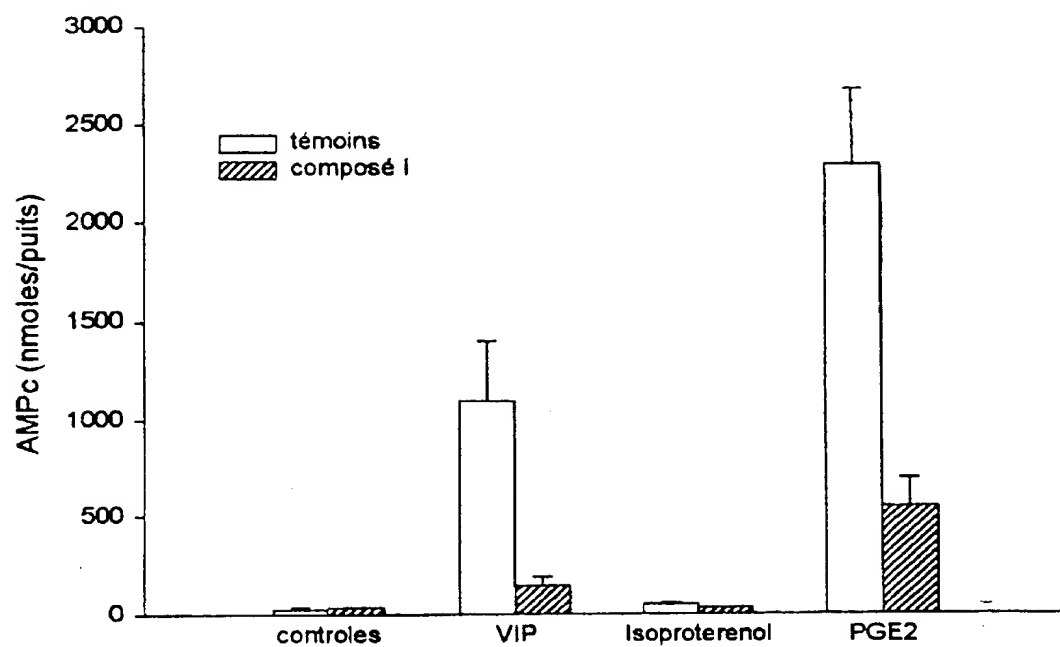


Figure 5

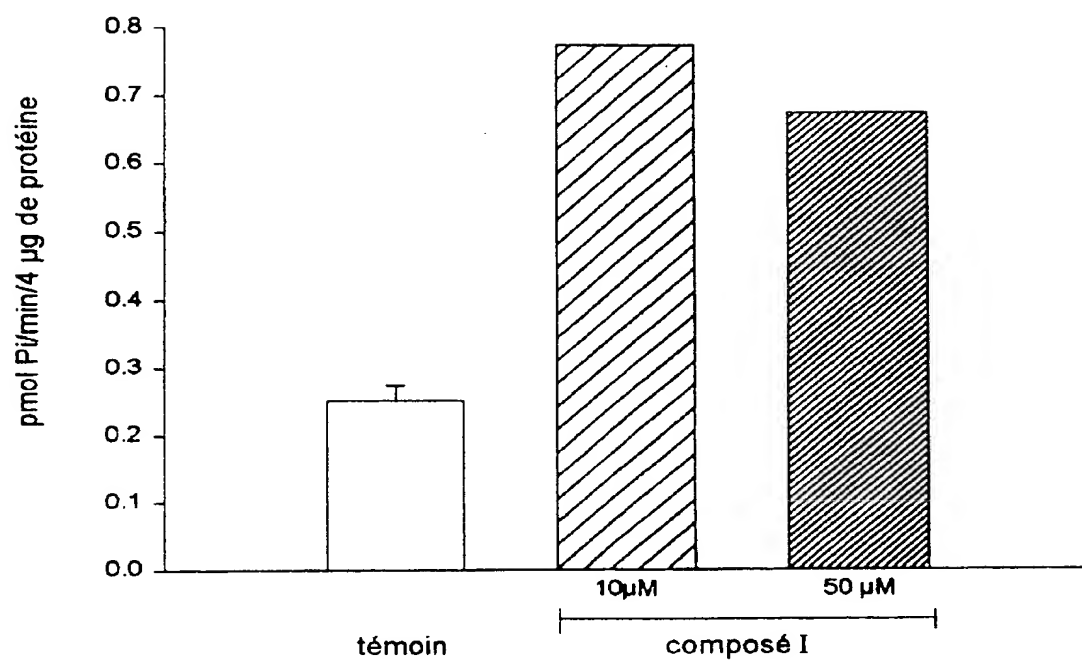


Figure 6

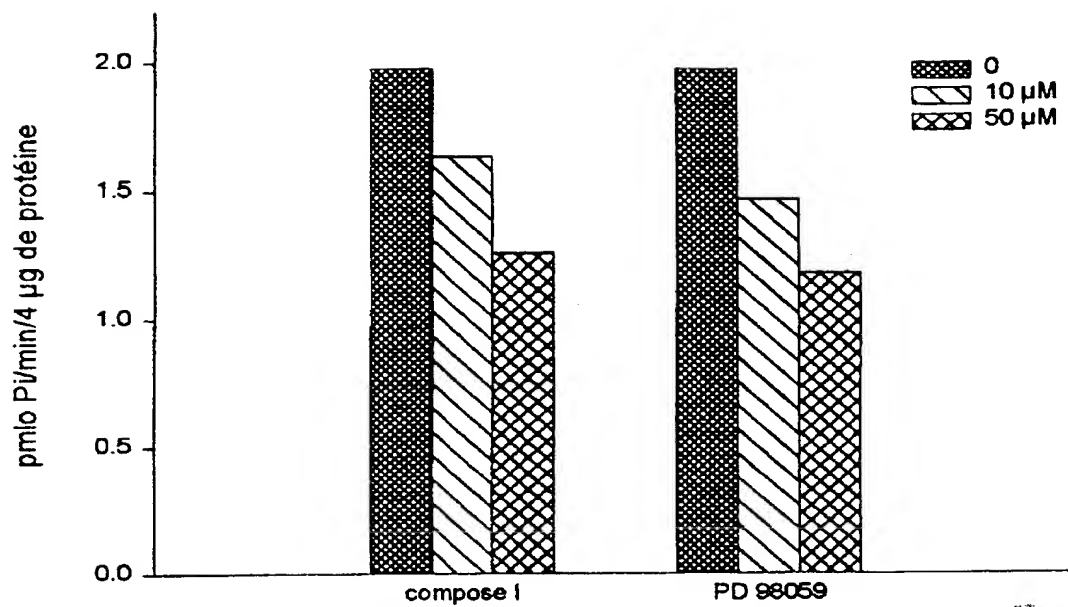


Figure 7



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|--|-----------|--|
| (51) Classification internationale des brevets ⁷ : C07D 487/04, A61K 31/495 // (C07D 487/04, 241:00, 235:00) | A3 | (11) Numéro de publication internationale: WO 00/02881 (43) Date de publication internationale: 20 janvier 2000 (20.01.00) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01609 (22) Date de dépôt international: 5 juillet 1999 (05.07.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/08731 8 juillet 1998 (08.07.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOCIÉTÉ DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (SCRAS) [FR/FR]; 51/53, rue du Docteur Blanche, F-75016 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PREVOST, Grégoire [FR/FR]; 12, avenue de la Providence, F-92160 Antony (FR). LONCHAMPT, Marie-Odile [FR/FR]; 30, rue Henri Crette, F-94550 Chevilly-Larue (FR). GORDON, Thomas [US/US]; 6 Rainbow Drive, Medway, MA 02053 (US). (74) Mandataire: BOURGOUIN, André; Beaufour Ipsen -- SCAF, Direction de la Propriété Industrielle, 42, rue du Docteur Blanche, F-75016 Paris (FR). | | (81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i> (88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 16 mars 2000 (16.03.00) |
| (54) Title: USE OF CYSTEINE DERIVATIVES FOR PREPARING A MEDICINE FOR TREATING PATHOLOGIES RESULTING FROM THE FORMATION OF HETEROTRIMERIC G PROTEIN (54) Titre: UTILISATION DE DERIVES DE LA CYSTEINE POUR PREPARER UN MEDICAMENT DESTINE A TRAITER LES PATHOLOGIES QUI RESULTENT DE LA FORMATION DE LA PROTEINE G HETEROTRIMERIQUE (57) Abstract <p>The invention concerns the use of cysteine derivatives for preparing a medicine for treating diseases resulting from the formation of heterotrimeric G protein. Said diseases include in particular diseases related to biological functions or the following disorders: smell, taste, light perception, neurotransmission, neurodegeneration, functioning of endocrine and exocrine glands, autocrine and paracrine regulation, blood pressure, embryogenesis, benign cell proliferation, oncogenesis, viral infection, immunological functions, diabetes, obesity, benign and malign proliferative diseases. Said cystein derivatives comprise in particular: bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylmethyl)-2-(2-methoxyphenyl)-5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,2a]pyrazine (I) disulphide; and bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(1-naphthyl)-8-(2-methylpropyl)-5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,2a]pyrazin-7-yl) disulphide (II).</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne l'utilisation de dérivés de la cystéine pour préparer un médicament destiné à traiter des maladies qui résultent de la formation de la protéine G hétérotrimerique. Ces maladies comprennent en particulier des maladies liées aux fonctions biologiques ou désordres suivants: odorat, goût, perception de la lumière, neurotransmission, neurodégénérescence, fonctionnement des glandes endocrines et exocrines, régulation autocrine et paracrine, tension artérielle, embryogénèse, prolifération cellulaire bénigne, oncogénèse, infection virale, fonctions immunologiques, diabète, obésité, et maladies prolifératives bénignes et malignes. Lesdits dérivés de la cystéine comprennent en particulier: le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-8-(cyclohexylmethyl)-2-(2-méthoxyphényl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazine (I); et le disulfure de bis-1,1'-[7-(2-amino-1-oxo-3-thiopropyl)-2-(1-naphthyl)-8-(2-méthylpropyl)-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2a]pyrazin-7-yle) (II).</p> | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | | | |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie | ES | Espagne | LS | Lesotho | SI | Slovénie |
| AM | Arménie | FI | Finlande | LT | Lituanie | SK | Slovaquie |
| AT | Autriche | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Sénégal |
| AU | Australie | GA | Gabon | LV | Lettonie | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaïdjan | GB | Royaume-Uni | MC | Monaco | TD | Tchad |
| BA | Bosnie-Herzégovine | GE | Géorgie | MD | République de Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbade | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tadjikistan |
| BE | Belgique | GN | Guinée | MK | Ex-République yougoslave de Macédoine | TM | Turkménistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | ML | Mali | TR | Turquie |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | MN | Mongolie | TT | Trinité-et-Tobago |
| BJ | Bénin | IE | Irlande | MR | Mauritanie | UA | Ukraine |
| BR | B Brésil | IL | Israël | MT | Malawi | UG | Ouganda |
| BY | Bélarus | IS | Islande | MX | Mexique | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada | IT | Italie | NE | Niger | UZ | Ouzbékistan |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon | NL | Pays-Bas | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NO | Norvège | YU | Yougoslavie |
| CH | Suisse | KG | Kirghizistan | NZ | Nouvelle-Zélande | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | République populaire démocratique de Corée | PL | Pologne | | |
| CM | Cameroun | KR | République de Corée | PT | Portugal | | |
| CN | Chine | KZ | Kazakhstan | RO | Roumanie | | |
| CU | Cuba | LC | Sainte-Lucie | RU | Fédération de Russie | | |
| CZ | République tchèque | LI | Liechtenstein | SD | Soudan | | |
| DE | Allemagne | LK | Sri Lanka | SE | Suède | | |
| DK | Danemark | LR | Libéria | SG | Singapour | | |
| EE | Estonie | | | | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/01609

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07D487/04 A61K31/495
235:00)

//(C07D487/04,241:00,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07C A61K C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | WO 97 30053 A (BIOMEASURE INC) 21 August 1997 (1997-08-21) cited in the application page 26; claims 29,30 | 1-7,11, 12 |
| A | the whole document | 8-10 |
| X | WO 96 21456 A (UNIV PITTSBURGH) 18 July 1996 (1996-07-18) cited in the application page 33; claim 37; figure 17 | 1-7,11, 12 |
| X | US 5 705 686 A (HAMILTON ANDREW ET AL) 6 January 1998 (1998-01-06) column 4, line 19 - line 23; figure 1 | 1-7,11, 12 |
| | -/-- | |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 October 1999

Date of mailing of the international search report

18 JAN 2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Frelon, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Int. Application No.

PCT/FR 99/01609

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | WO 97 38697 A (UNIV PENNSYLVANIA ;UNIV PITTSBURGH (US)) 23 October 1997 (1997-10-23) page 4 -page 5; figures 2-4,7 --- | 1-7,11, 12 |
| X | FR 2 736 638 A (RHONE POULENC RORER SA) 17 January 1997 (1997-01-17) page 4; claim 1 ----- | 1-7,11, 12 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 99/01609

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see supplemental sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-12 / (part concerning compounds (A))

Remark on Protest



The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

1. Claims: 1-12 (part concerning compounds (A))

Compounds of formula (A)

The unity of the demand should rest on one novel feature common to the whole set of claimed inventions.

Said feature cannot be derived from the only fact that "it is used for therapeutic purposes" (independently of other modes of action which can vary and concern the field of non-patentable discoveries) which turns out to be known in particular for uses against tumours (see citations of the search report). Moreover it would run counter to the principle according to which the subject matter cannot be defined by the desired result concerning structures whereof the definition is not sufficiently specific (therefore the search concerning B cannot be exhaustive).

There is unity of invention when the alternatives are similar in nature and are considered as such if ALL the alternatives have one common characteristic or activity and if there exists a common STRUCTURE, that is an "ESSENTIAL structural element common to ALL the alternatives"(...) and in the case where the compounds only share in common a small part of their structure as in the present application, the common structure represents a part structurally DISTINCT from prior art (PCT Guidelines III-7.4)

There is no apparent constant structure common to all the compounds (A), (B) and (C) which is likewise novel (the 3-mercapto-2-amino-propyl structure is known for the activity mentioned).

A search was carried out only concerning the first subject matter.

2. Claims: 1-7 (part concerning compounds (B))

Compounds of formula (B)
(see comment above)

3. Claims: 1-7 (part concerning compounds (C))

Compounds of formula (C)
(see comment above)

Continuation of Box I.2

Claims 1, 2, 6, 7, 9-12 concern the use of a very wide variety of compounds. However, a support basis as defined by PCT Article 6 and/or a disclosure as defined by PCT Article 5 can only be found for a very limited number of the claimed compounds. The terms and expressions used, such as alkyl, aryl, heterocycle, optionally substituted, without any precision concerning the limits of the field covered by them, do not enable a significant search covering the whole claimed spectrum. Consequently, the search was restricted to those parts of the claims supported and disclosed, that is those parts concerning compounds prepared in the examples and their close homologues illustrating the compounds of formula (A) (see also objection on grounds of lack of unity).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, concerning inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of a preliminary examination report (PCT Rule 66.1 (e)). The applicant is warned that the guideline adopted by the EPO acting in its capacity as International Preliminary Examining Authority is not to proceed with a preliminary examination of a subject matter unless a search has been carried out thereon. This position will remain unchanged, notwithstanding that the claims have or have not been modified, either after receiving the search report, or during any procedure under Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01609

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|------------|---------------------|
| WO 9730053 | A | 21-08-1997 | AU | 1964597 A | 02-09-1997 |
| | | | CA | 2245823 A | 21-08-1997 |
| | | | CN | 1216545 A | 12-05-1999 |
| | | | EP | 0904274 A | 31-03-1999 |
| | | | PL | 328513 A | 01-02-1999 |
| | | | ZA | 9701254 A | 14-07-1998 |
| | | | | | |
| WO 9621456 | A | 18-07-1996 | US | 5705686 A | 06-01-1998 |
| | | | US | 5834434 A | 10-11-1998 |
| | | | AU | 4915796 A | 31-07-1996 |
| | | | CA | 2207252 A | 18-07-1996 |
| | | | EP | 0794789 A | 17-09-1997 |
| | | | JP | 10512266 T | 24-11-1998 |
| | | | US | 5965539 A | 12-10-1999 |
| | | | | | |
| US 5705686 | A | 06-01-1998 | US | 5602098 A | 11-02-1997 |
| | | | AU | 4915796 A | 31-07-1996 |
| | | | CA | 2207252 A | 18-07-1996 |
| | | | EP | 0794789 A | 17-09-1997 |
| | | | JP | 10512266 T | 24-11-1998 |
| | | | WO | 9621456 A | 18-07-1996 |
| | | | US | 5965539 A | 12-10-1999 |
| | | | US | 5834434 A | 10-11-1998 |
| | | | US | 5856310 A | 05-01-1999 |
| | | | | | |
| WO 9738697 | A | 23-10-1997 | AU | 2671697 A | 07-11-1997 |
| | | | CA | 2251716 A | 23-10-1997 |
| | | | EP | 0910385 A | 28-04-1999 |
| | | | | | |
| FR 2736638 | A | 17-01-1997 | AU | 6523396 A | 10-02-1997 |
| | | | CA | 2224411 A | 30-01-1997 |
| | | | EP | 0842150 A | 20-05-1998 |
| | | | WO | 9703047 A | 30-01-1997 |
| | | | JP | 11508911 T | 03-08-1999 |
| | | | US | 5889053 A | 30-03-1999 |
| | | | | | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dern. Internationale No
PCT/FR 99/01609

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07D487/04 A61K31/495
235:00)

//(C07D487/04,241:00,

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C07C A61K C07D

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|---|-------------------------------|
| 2 X | WO 97 30053 A (BIOMEASURE INC) 21 août 1997 (1997-08-21) cité dans la demande page 26; revendications 29,30 le document en entier | 1-7,11, 12 |
| A | --- | 8-10 |
| 2 X | WO 96 21456 A (UNIV PITTSBURGH) 18 juillet 1996 (1996-07-18) cité dans la demande page 33; revendication 37; figure 17 | 1-7,11, 12 |
| 3 X | US 5 705 686 A (HAMILTON ANDREW ET AL) 6 janvier 1998 (1998-01-06) colonne 4, ligne 19 - ligne 23; figure 1 --- -/- | 1-7,11, 12 |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 octobre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18. JAN. 2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Frelon, D

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No

PCT/FR 99/01609

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cites. avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visees |
|-----------|--|-------------------------------|
| 4 | <p>X WO 97 38697 A (UNIV PENNSYLVANIA ;UNIV PITTSBURGH (US)) 23 octobre 1997 (1997-10-23) page 4 -page 5; figures 2-4,7 ---</p> | <p>1-7,11, 12</p> |
| 3 | <p>X FR 2 736 638 A (RHONE POULENC RORER SA) 17 janvier 1997 (1997-01-17) page 4; revendication 1 -----</p> | <p>1-7,11, 12</p> |
| 2 | | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR 99/01609

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n°
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n°
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°
4. ☒ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°
1-12 (partie composés A)

Remarque quant à la réserve

- ☒ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

1. revendications: 1-12 (partie composés (A))

Composés de formules (A)

L'unité de la demande doit reposer sur une caractéristique nouvelle commune à l'ensemble des inventions revendiquées.

Cette caractéristique ne peut pas être le seul fait de "l'utilisation dans un but thérapeutique" (indépendamment des modes d'action qui peuvent varier et relèvent du domaine des découvertes non brevetables) qui s'avère être connu en particulier pour les applications antitumorales (voir citations du rapport de recherche).

De plus cela irait à l'encontre du principe selon lequel on ne peut définir l'objet revendiqué par le résultat recherché quand il s'agit de structures dont la définition n'est pas assez spécifique (ainsi la recherche sur B ne peut pas être complète).

Il existe une unité d'invention lorsque les variantes sont de nature similaires et sont considérées comme telles si TOUTES les variantes ont une caractéristique ou une activité commune et s'il existe une STRUCTURE commune, c'est-à-dire un "élément structurel ESSENTIEL commun à TOUTES les variantes"(...) et dans le cas où les composés n'ont en commun qu'une petite partie de leur structure comme dans la demande présente, la structure commune représente une partie structurellement DISTINCTE de l'état de la technique (Directives III-7.4).

Il n'apparaît pas de structure constante et commune à tous les composés (A), (B) et (C) qui soit également nouvelle (la structure 3-mercapto-2-amino-propyl est connue pour l'activité nommée).

Seul le premier sujet a été recherché.

2. revendications: 1-7 (partie composés (B))

Composés de formule (B)

(voir commentaire précédent)

3. revendications: 1-7 (partie composés (C))

Composés de formule (C)

(voir commentaire précédent)

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Les revendications 1,2,6,7,9-12 présentes ont trait à l'utilisation d'une très grande variété de composés. Un fondement au sens de L'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint des composés revendiqué(e)s. Des termes et expressions employés, tels que alkyle, aryle, hétérocycle, éventuellement substitué, sans précision sur les limites du domaine qu'ils circonscrivent, ne permettent pas une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux composés préparés dans les exemples et leurs homologues proches illustrant les composés de formule (A) (voir aussi objection de non-unité).

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem : Internationale No

PCT/FR 99/01609

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|--------------|------------------------|---|------------------------|
| WO 9730053 | A | 21-08-1997 | AU 1964597 | A 02-09-1997 |
| | | | CA 2245823 | A 21-08-1997 |
| | | | CN 1216545 | A 12-05-1999 |
| | | | EP 0904274 | A 31-03-1999 |
| | | | PL 328513 | A 01-02-1999 |
| | | | ZA 9701254 | A 14-07-1998 |
| ----- | | | | |
| WO 9621456 | A | 18-07-1996 | US 5705686 | A 06-01-1998 |
| | | | US 5834434 | A 10-11-1998 |
| | | | AU 4915796 | A 31-07-1996 |
| | | | CA 2207252 | A 18-07-1996 |
| | | | EP 0794789 | A 17-09-1997 |
| | | | JP 10512266 | T 24-11-1998 |
| US 5965539 | A 12-10-1999 | | | |
| ----- | | | | |
| US 5705686 | A | 06-01-1998 | US 5602098 | A 11-02-1997 |
| | | | AU 4915796 | A 31-07-1996 |
| | | | CA 2207252 | A 18-07-1996 |
| | | | EP 0794789 | A 17-09-1997 |
| | | | JP 10512266 | T 24-11-1998 |
| | | | WO 9621456 | A 18-07-1996 |
| | | | US 5965539 | A 12-10-1999 |
| | | | US 5834434 | A 10-11-1998 |
| US 5856310 | A 05-01-1999 | | | |
| ----- | | | | |
| WO 9738697 | A | 23-10-1997 | AU 2671697 | A 07-11-1997 |
| | | | CA 2251716 | A 23-10-1997 |
| | | | EP 0910385 | A 28-04-1999 |
| ----- | | | | |
| FR 2736638 | A | 17-01-1997 | AU 6523396 | A 10-02-1997 |
| | | | CA 2224411 | A 30-01-1997 |
| | | | EP 0842150 | A 20-05-1998 |
| | | | WO 9703047 | A 30-01-1997 |
| | | | JP 11508911 | T 03-08-1999 |
| | | | US 5889053 | A 30-03-1999 |
| ----- | | | | |